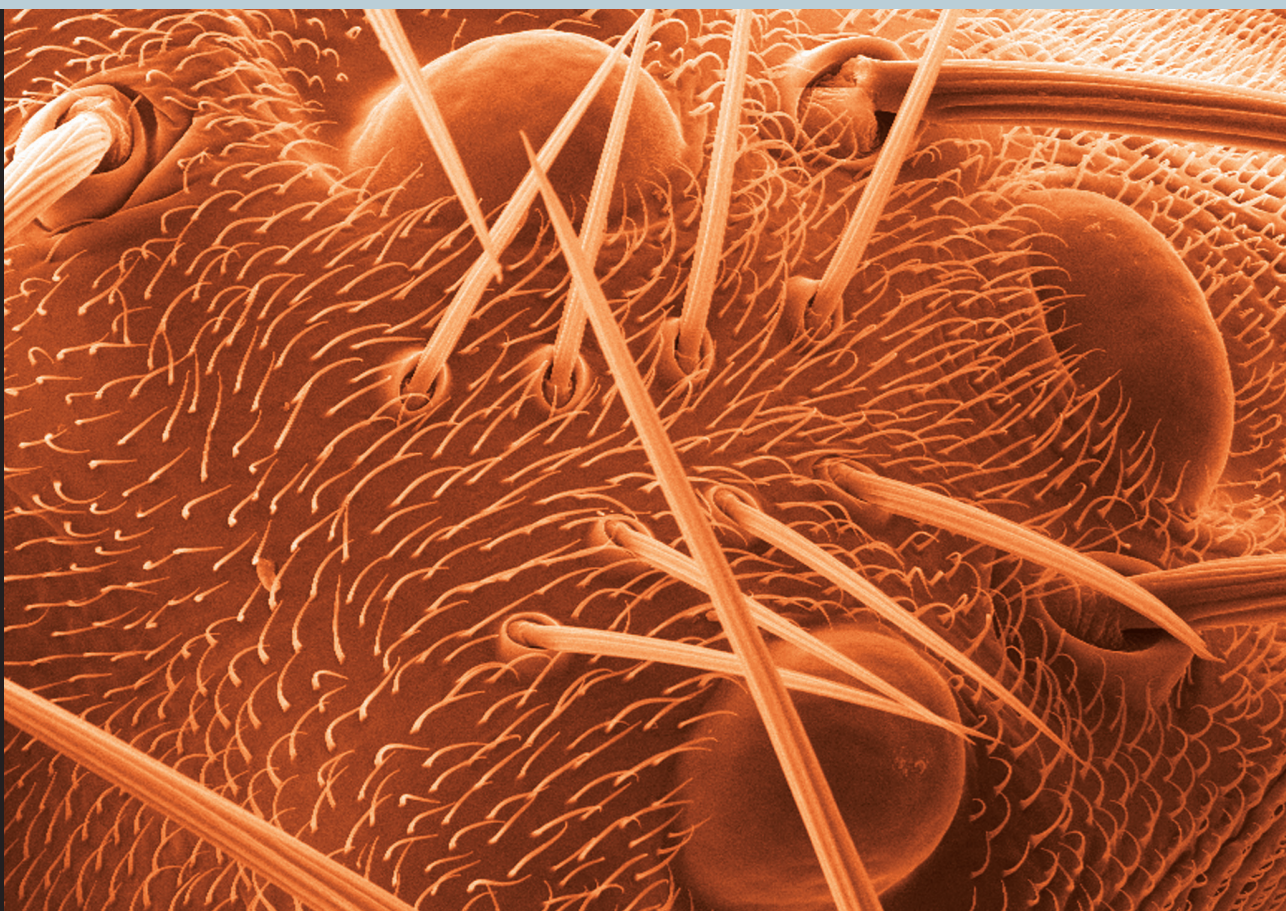


# **Estudio de la Red de Regulación Génica que Controla la Especificación y Organización del Sistema Ocular en** *Drosophila melanogaster*



Tesis Doctoral  
**M<sup>a</sup> Ángeles Domínguez Cejudo**











## **Tesis Doctoral**

### **Estudio de la Red de Regulación Génica que Controla la Especificación y Organización del Sistema Ocular en *Drosophila melanogaster***

María Angeles Domínguez-Cejudo

**Director: Dr. Fernando Casares Fernández**

**Septiembre 2014**



“Defiende tu derecho a pensar, porque incluso  
pensar de manera errónea es mejor que no pensar”  
*Hypatia de alejandria*

*A mi madre y  
a mis hermanas*



<b>I. Abreviaturas</b>	<b>11</b>
<b>II. Summary</b>	<b>17</b>
<b>III. Resumen</b>	<b>21</b>
<b>IV. Introducción</b>	<b>25</b>
1.- Control de la expresión génica como origen de la diversidad celular	<b>27</b>
<i>Los genes selectores y las vías de señalización</i>	
<i>Las regiones cis-reguladoras</i>	
2.- El disco de ojo antena (DOA) de <i>Drosophila</i> como modelo de análisis de las redes de regulación génica que controlas distintos destinos celulares	<b>31</b>
<i>Breve introducción a <i>Drosophila melanogaster</i></i>	
<i>Origen embrionario del DOA y su desarrollo larvario</i>	
<i>Establecimiento de los diferentes primordios en el DOA: dinámica de expresión de los genes selectores y de señalización</i>	
<i>El sistema visual de <i>Drosophila</i>: el ojo compuesto y el ocelo</i>	
<b>V. Objetivos</b>	<b>39</b>
<b>VI. Materiales y métodos</b>	<b>41</b>
1.- Manipulación genética y cepas de <i>Drosophila</i>	<b>45</b>
1.1.- Sistema Gal4/UAS	
1.2.- Análisis clonal	
<i>Clones de pérdida de función</i>	
<i>Clones de ganancia de función</i>	
1.3.- Sistema G-TRACE	
1.4.- Otras líneas	
<i>Líneas reporteras</i>	
<i>Alelos mutantes</i>	
2.- Inmunohistoquímica y microscopía	<b>49</b>
<i>Inmunofluorescencia en disco imaginales</i>	
<i>Inmunofluorescencia en embriones</i>	
<i>Tinción X-Gal</i>	
3.- Preparación de cutículas adultas y larvarias	<b>51</b>
<i>Cutículas adultas</i>	
<i>Cutículas larvarias</i>	
4.- Cuantificaciones y perfiles de expresión	<b>51</b>

4.1.- Perfiles de expresión	
4.2.- Ensayo de fluctuación térmica	
4.3.- Medición del complejo ocelar	
<b>VII. Resultados</b>	<b>53</b>
CAPITULO 1: Especificación del complejo ocelar	<b>55</b>
1.1.- <i>engrailed</i> ( <i>en</i> ) como gen diana de Hh durante la formación del complejo ocelar	
1.2.- Dinámica de la expresión de <i>eya</i> y la vía de Hh durante el desarrollo ocelar	
1.3.- <i>en</i> reprime la vía de señalización de Hh para especificar la región interocelar	
1.4.- La vía de señalización Delta:Notch mantiene la expresión de <i>en</i> para especificar la región interocelar	
1.5.- <i>hth</i> controla la extensión externa ocelar mediante la represión de <i>eya</i>	
1.6.- La Red de Regulación Génica es robusta frente a fluctuaciones	
1.7.- Especificación del ocelo <i>versus</i> especificación del ojo compuesto	
CAPITULO 2: Identidad regional en la cabeza dorsal de <i>Drosophila</i> : el papel del gen selector <i>orthodenticle</i> y las vías de señalización de Hh y Wnt	<b>71</b>
2.1.- <i>wg</i> no reprime la transcripción de <i>hh</i> sino sus genes diana <i>eya</i> y <i>en</i>	
2.2.- <i>hh</i> es necesario para la activación del <i>enhancer</i> auto-regulador de <i>otd</i> .	
2.3.- El dominio de expresión de <i>hh</i> se contrae durante el tercer estadio larvario.	
2.4.- <i>en</i> mantiene la transcripción de <i>hh</i> en la región interocelar	<b>85</b>
CAPITULO 3: Refinamiento del patrón final aOC-RIO-pOC: el papel del gen <i>Six3/Optix</i> durante el desarrollo ocelar	
3.1.- <i>Six3/Optix</i> se expresa de manera asimétrica en el complejo ocelar y se requiere para el desarrollo del ocelo anterior	
3.2.- <i>Optix</i> no reprime la expresión de <i>wg</i> en el ocelo anterior	

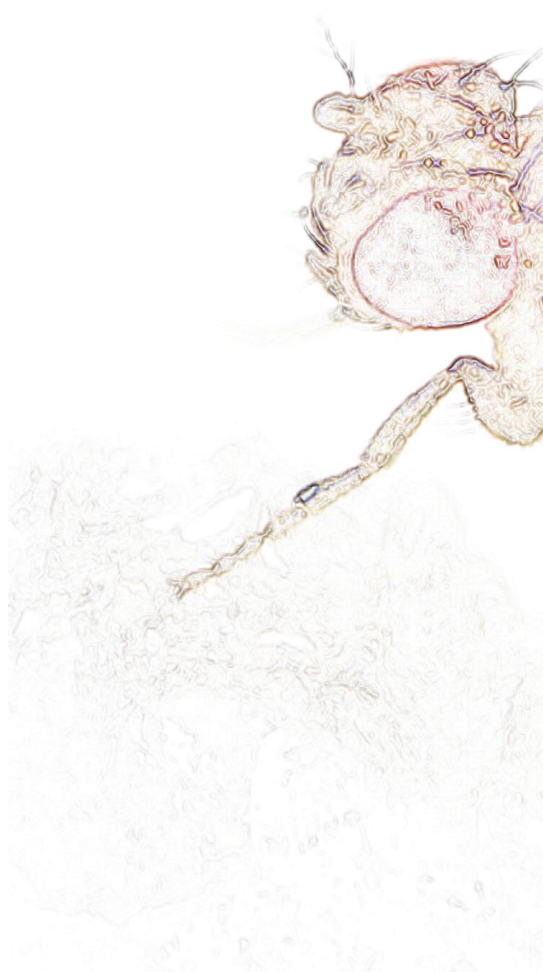
durante el desarrollo larvario	
3.3.- El gen <i>Six3/Optix</i> actúa como represor de <i>en</i> en el ocelo anterior	
3.4.- La expresión de <i>Optix</i> está limitada al ocelo anterior por la acción negativa de <i>en</i> en la RIO	
3.5.- Regulación de la expresión de <i>Optix</i> durante el desarrollo del CO	
CAPITULO 4: Otros factores implicados en el desarrollo del CO: el complejo Iroquois y la vía EGFR	98
<b>VIII. Discusión</b>	103
1.- <i>en</i> , gen diana de la vía de Hh, es requerido para la especificación de la RIO	107
2.- La vía de señalización de Hh y la activación de sus genes diana <i>eya</i> y <i>en</i>	108
3.- Dinámica de la transcripción de <i>hh</i>	110
4.- <i>Six3/Optix</i> como sistema anti-represor para establecer la identidad anterior	111
5.- El establecimiento de la asimetría en el complejo ocelar	114
<b>IX. Conclusiones</b>	119
<b>X. Agradecimientos</b>	123
<b>XI. Referencias</b>	127
<b>XII. Apéndice I.</b> Modelo matemático.	149
<b>XIII. Apéndice II.</b> A Hh-driven gene network controls specification, pattern and size of the <i>Drosophila</i> simple eyes.	173
<b>XIV. Apéndice III.</b> Regulation of ocular specification and size by twin of eyeless and homothorax.	205





# Abreviaturas

---





Abd-A	Abdominal-A
Abd-B	Abdominal-B
Ant	Antennapedia
aOC	Ocelo Anterior
AP	Anterior-Posterior
Ara	Araucan
Arm	Armadillo
Caup	Caupolican
Cb	Cerebro
Ci	Cubitus interruptus
CiA	Cubitus interruptus Activador
CLb	Clípeo-labro
CO	Complejo Ocelar
CRM	cis-regulatory modules
CycD	Ciclina D
CycE	Ciclina D
Dac	Dachsund
DI	Delta
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOA	Disco Ojo-Antena
Dpp	Decapentaplegic
EGFR	Epidermal growth factor receptor
En	Engrailed
Exd	Extradenticle
Ey	Eyeless
Eya	Eye Absents
Eyg	Eyegone
Fr	Fringe
FT	Factor de Transcripción
G-TRACE	Gal4 technique for real-time and clonal expression
GDR	Genes determinantes de la Retina
GFP	Green Fluorescent Protein
Gro	Groucho
Hh	Hedgehog



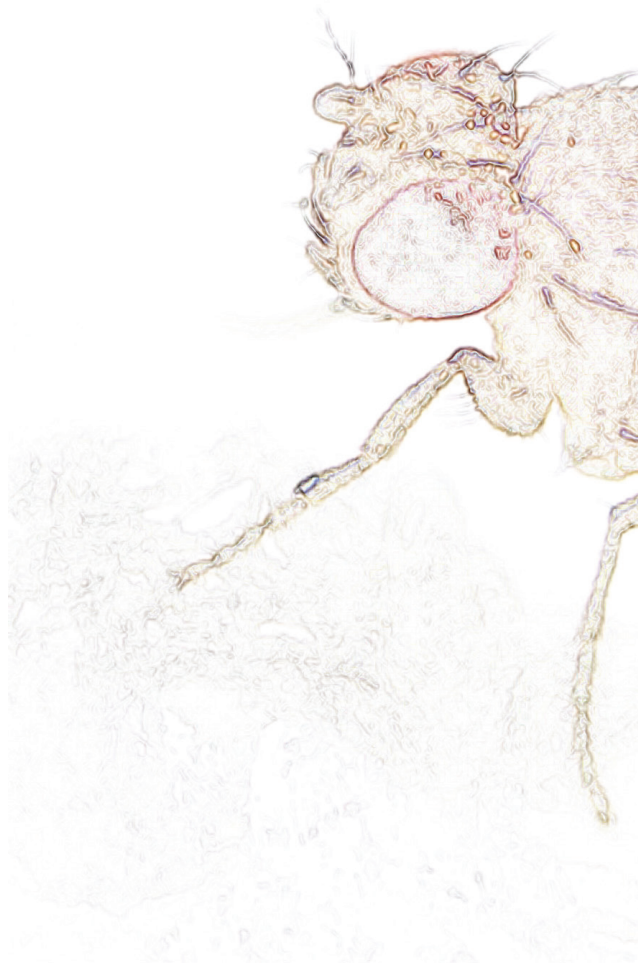
hpf	Horas post-fertilización
Hth	Homothorax
Inv	Invected
Iro-C	Complejo Iroquois
JAK	Janus Kinase
KD	Knock-Down
lab	labial
mam	mastermind
Mirr	Mirror
N	Notch
Nts	Notch termo-sensible
OB	Órgano de Bolwig
oc	ocelliless
OE	Over Expression (Sobre-expresión)
Os	outstretched
Otd	Orthodenticle
pb	proboscipedia
Pmad	mothers against dpp fosforilado
pOC	Ocelo Posterior
ptc	Patched
RFP	Red Fluorescent Protein
RIO	Región Interocelar
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
RRG	Red de Regulación Génica
Scr	Sex combs reduced
Ser	Serrate
SHh	Sonic Hedgehog
SM	Surco morfogenético
Smo	Smoothened
So	Sine oculis
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Su(H)	Supressor of Hairless
Tkv	Thickveins

Toy	Twin of eyeless
UAS	Upstream Activator Sequence
Ubx	Ultrabithorax
Upd	Unpaired
Wg	Wingless
WT	Wild type
Yki	Yorkie





# Summary





One of the most impressive biological discoveries of the last decades is that different multicellular animals groups, independently of their divergence, share the regulatory genes that control the major aspects of cell specification and differentiation during the establishment of the body plan. These regulatory genes encode for transcription factors (TFs) and signaling molecules and control the expression of both effector genes, which carry out cellular functions, and other TFs. These interactions constitute gene regulatory networks, which, eventually, drive specification and patterning events during developmental progression and define the different trajectories cells can follow. Therefore, knowing how these gene regulatory networks (GRNs) function is essential for understanding the origin of functional and morphological diversity observed in the animal kingdom. The description of a GRN related with a specific developmental process requires finding out what TFs and signaling molecules are involved in it, when and where TFs and signaling molecules are expressed and how they interact with each other.

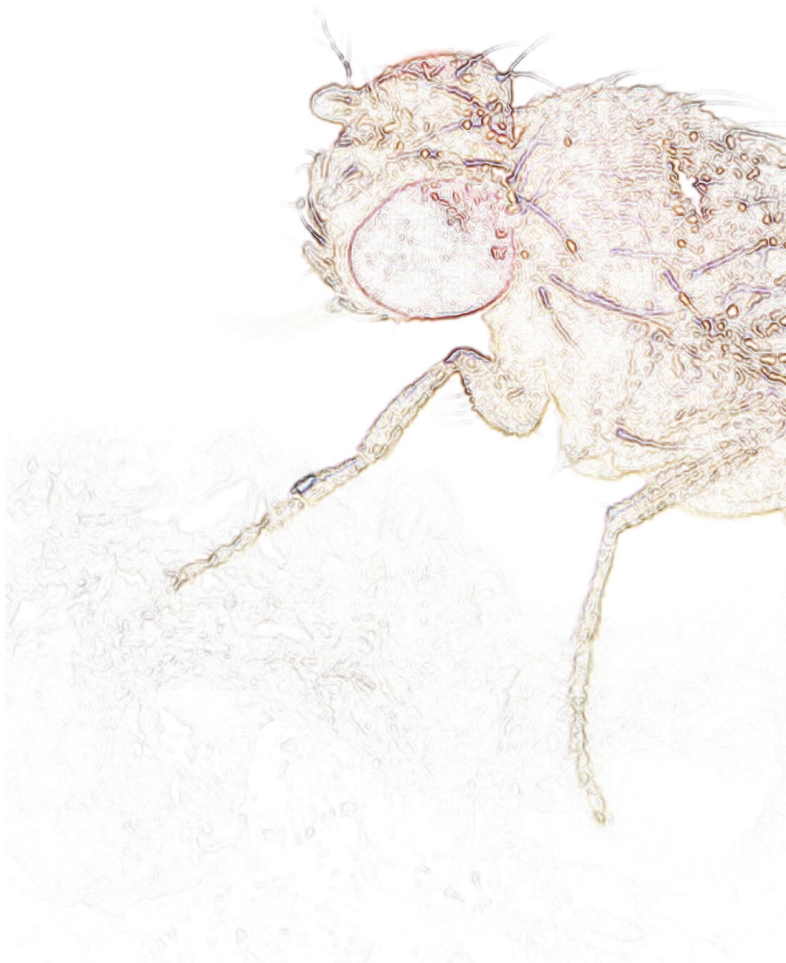
In this PhD project, we have explored these issues in the GRN that control the specification and patterning of the ocelli in *Drosophila melanogaster*. The ocellar complex (OCx) is located on the dorsal adult head. It comprises three small eyes, called ocelli (OC), each located at the vertices of a triangular patch of cuticle that harbors an array of small sensory bristles (one anterior [aOC] and two posterior [pOC] ocelli), the is so-called interocellar region (IOR). Structurally, the ocelli are simple camera-type eyes, present in most insects, are extremely sensitive light detectors involved in stabilization of flight and in the escape response triggered by sudden light intensity changes.

The dorsal head is formed by the fusion of the two antero-dorsal domains of the eye-antennal imaginal discs. These domains are specified by the dynamic action of two signaling pathways, the Wingless signaling pathway (Wg; the *Drosophila* homolog Wnt1) and that of Hedgehog (Hh), and *orthodenticle* (*otd*), a TF, and founding member of the Otx family. Previous works had demonstrated functional relationship between these genes, which result in the subdivision of the dorsal head into three distinct territories, from lateral to medial: orbital cuticle (COrb), frons (Fr) and OCx. The last one is further subdivided into three domains; two of them are the ocelli precursors, split by an IOR precursor domain. The correct formation of these subdomains requires the activation by the Hh signaling pathway of *eyes absent* and *sine oculis* (*eya/so*; in the ocelli precursors) and *engrailed* (*en*; in the interocellar cuticle precursors), resulting in the final pattern aOC-IOR-pOC. In this thesis, we have investigated how these two mutually exclusive cell fates are established in this simple pattern under the control of the Hh signaling pathway. Our results highlight that early *hh* expression throughout the OCx is required to activate the expression of the Hh's targets *eya* and *en*; however, we find that the establishment of mutually exclusive domains of "normal" size requires the addition



of new factors and/or new functional interactions. On the one hand, we have found that Optix, the *Drosophila* homolog of the Six3/6 subfamily of Six TFs, is required in an anti-repressor mechanism to restrict *en* expression in the prospective IOR, which, otherwise, would act as a negative regulator of ocellar fate. On the other hand, we show how the establishment of feedback loops during the patterning process stabilizes gene expression in their respective action domains, fixing their size.

# Resumen





Uno de los descubrimientos biológicos más importante de las últimas décadas es que los diferentes grupos de animales multicelulares, no importa cuán divergentes sean, comparten los genes reguladores que controlan los aspectos principales de especificación y diferenciación celular durante el establecimiento del plan corporal. Estos genes reguladores codifican factores de transcripción (FTs) y moléculas de señalización que controlan tanto la expresión de genes efectores, los cuales realizan funciones celulares, como la expresión de otros FTs. Los FTs y vías de señalización forman así redes de regulación que son, finalmente, las que gobiernan la especificación y organización celular durante el progreso del desarrollo y determinan la trayectoria que una célula puede seguir. Conocer, por tanto, cómo operan estas redes de regulación génica (RRGs) es esencial para entender el origen de la diversidad funcional y morfológica observada en los distintos organismos a lo largo de la evolución. Describir una RRG relacionada con un proceso de desarrollo determinado requiere conocer qué FTs y moléculas de señalización están implicados en el sistema, cuándo y dónde se expresan los genes que los codifican y cómo interaccionan unos con otros.

En esta tesis hemos explorado estos aspectos en la RRG que controla la especificación y organización del sistema ocelar en *Drosophila melanogaster*. El sistema o complejo ocelar (CO) es una porción de cutícula triangular, localizada en la cabeza dorsal y en cuyos vértices se encuentran los ocelos. Los ocelos son tres ojos simples [un ocelo anterior (o medial) y dos posteriores (o laterales)] y junto con los ojos compuestos conforman el sistema visual adulto de muchos insectos, donde son esenciales para la estabilización del vuelo y como detectores de movimiento. La cutícula que separa los ocelos y que alberga quetas sensoriales se denomina región interocelar (RIO).

La cabeza dorsal se forma a partir de la fusión de los dominios anterior-dorsales del disco de ojo. Este dominio es especificado por la acción dinámica de dos vías de señalización: la vías de Wingless (Wg; el homólogo en *Drosophila* de Wnt1) y de Hedgehog (Hh); y *orthodenticle* (*otd*), un FT miembro de la familia Otx. Trabajos anteriores han descubierto algunas de las relaciones funcionales principales entre estos genes, las cuales resultan en la partición de la cabeza dorsal en tres territorios. De lateral a medial, éstos son: cutícula orbital (CO<sub>rb</sub>), frente (Fr) y CO. Este último es posteriormente dividido en tres subdominios, dos dominios precursores de los ocelos, separados por un dominio precursor de la región interocelar (RIO). La formación de estos subdominios requiere de la activación de los FTs *eyes absent* y *sine oculis* (*eya/so*; precursores de los ocelos) y *engrailed* (*en*; precursor de la cutícula interocelar) por la vía de Hh, obteniéndose un patrón final aOC-RIO-pOC. En esta tesis, hemos investigado cómo se establecen estos destinos celulares alternativos bajo el control de la vía de Hh. Nuestros resultados resaltan que la expresión temprana de *hh* a lo largo de todo el CO es necesaria





para activar la expresión de los genes diana *eya* y *en*; sin embargo, no es suficiente para restringir sus dominios de acción en regiones discretas bien delimitadas. La obtención del patrón final requiere, por tanto, la adición de nuevos factores y/o nuevas interacciones funcionales. Aquí mostramos cómo, por un lado, la acción del FT Optix, el homólogo en *Drosophila* de la subfamilia Six3/6, es requerido como mecanismo anti-represor para restringir la expresión de *en* en la futura RIO, quien, de lo contrario, actúa como regulador negativo del destino ocelar. Por otro lado, mostramos cómo el establecimiento de bucles de retroalimentación, a lo largo del proceso, estabiliza la expresión de los distintos genes en sus dominios de acción.

# Introducción





## 1.- Control de la expresión génica como origen de la diversidad celular

De los miles de genes que forman el genoma de un organismo, sólo una fracción relativamente pequeña determina el desarrollo del plan corporal, incluyendo número, identidad y organización de las diferentes partes del cuerpo. Este hecho resulta contradictorio si tenemos en cuenta la enorme cantidad de sucesos que se precisan para la construcción de un organismo adulto desde el embrión, más aún, si consideramos que el DNA de todas, o casi todas, las células de un animal es idéntico. Entonces, ¿cómo adquieren las células la morfología y propiedades funcionales únicas en los diversos órganos y tejidos del cuerpo? La explicación a esta paradoja la encontramos en el control de la expresión génica. Incluso la bacteria unicelular más simple puede controlar la expresión de sus genes y usarlos de manera selectiva –por ejemplo, activando o reprimiendo genes que codifican para enzimas necesarias para digerir los nutrientes obtenidos a partir de diferentes fuentes de alimento disponibles. En organismos multicelulares este control de la expresión génica es de especial importancia, ya que a partir de una única célula fecundada, la cual se divide un número finito de veces de manera controlada espacial y temporalmente, se genera todo el conjunto de células diferenciadas que forman el adulto. Además, este control también está implicado en el mantenimiento de los órganos y tejidos durante la vida adulta, especialmente en aquellos que se renuevan de manera continua (glóbulos rojos, células de la piel, epitelio intestinal, etc.) [revisado en (Struhl, 1999; Reményi et al., 2004)].

### Los genes selectores y las vías de señalización

Este proceso de control de la expresión diferencial de los genes es realizado por los llamados genes selectores. Los genes selectores codifican factores de transcripción (FTs), los cuales regulan la actividad de otros genes. Durante el proceso de desarrollo, la combinación espacial y temporal de los patrones de expresión de estos FTs permite la definición progresiva de distintos grupos celulares, mediante la regulación selectiva de los genes diana. Esta progresión de ‘estados regulatorios’ crea territorios de células que finalmente originarán las diversas partes de una estructura, órgano o tejido. La figura I.1 ilustra, tomando como ejemplo *Drosophila*, los territorios de acción de diferentes FTs, los cuales actúan como selectores de dominios cada vez más específicos hasta alcanzar una resolución que conduce a la célula (o grupo de células) a un proceso de diferenciación terminal (Mann and Morata, 2000; Mann and Carroll, 2002; revisión genes selectores en *Drosophila*).

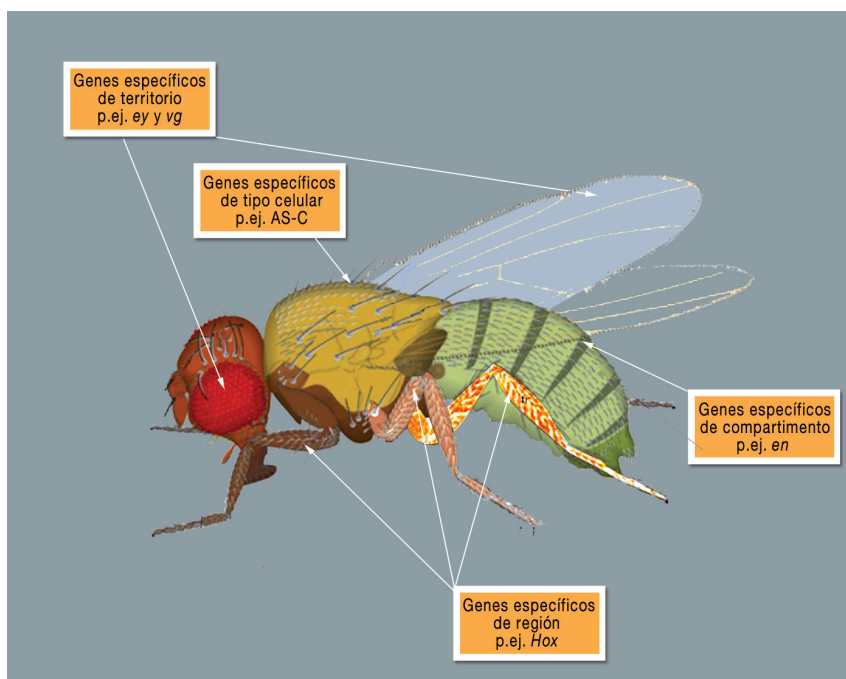


Figura I.1. Genes selectores en *Drosophila* y su rango de acción

Los genes selectores de región, como los genes Hox, gobiernan el desarrollo de regiones discretas del plan corporal, generalmente en un subdominio a lo largo del eje anterior-posterior. Los genes específicos de compartimentos, como *en*, gobiernan el desarrollo de compartimentos, tales como el compartimento posterior en *Drosophila*. Los genes específicos de territorio, como *ey* y *vestigial* (*vg*) conducen el desarrollo de territorios de células como el ojo o el ala. Los genes específicos de tipo celular, como los genes que forman el complejo Achaete-Scute, gobiernan el desarrollo de un tipo específico de células, tales como las quetas del notum. Por sencillez sólo se muestra un subconjunto del patrón de expresión de cada gen. Adaptado de (Mann and Morata, 2000; Mann and Carroll, 2002).

Pero las células no se encuentran aisladas durante este proceso de adquisición de la identidad, sino que se encuentran en continuo contacto unas con otras y con el medio extracelular. El éxito del proceso de desarrollo, por tanto, no depende solo de lo que ocurre dentro de la célula, sino que también depende de la capacidad de las células de interaccionar con el ambiente y responder a estas interacciones. Por ello, una segunda categoría de genes de desarrollo codifica para proteínas involucradas en los procesos de señalización celular, ya sean ligandos, receptores o componentes implicados en la transmisión extracelular e intracelular de la señal. La habilidad de las células de percibir y responder correctamente a estas señales es esencial para el correcto progreso del desarrollo. Durante estos procesos, se producen principalmente dos tipos de señalización: las que actúan por contacto directo; y las que, a través de la secreción del receptor, actúan a cierta distancia. Esta secreción al medio extracelular crea un gradiente de concentración, el cual disminuye con la distancia sobre la fuente. Las células que reciben la señal, son

capaces de detectar los niveles de señalización y regular así la expresión diferencial de los genes diana (en su mayoría FTs) de una manera dependiente de la concentración (Wolpert, 1969). Un ejemplo de esta actividad morfogénica la encontramos en el desarrollo embrionario del tubo neural de vertebrados. Durante sus primeras etapas de desarrollo, el tubo neural consiste en una población progenitora homogénea. Aquí, Sonic Hedgehog (SHh; miembro de la familia de vías de señalización Hh) secretado desde la notocorda y la placa suelo, ambos localizados en la línea medial-ventral del tubo neural, forma un gradiente de concentración. Este gradiente es interpretado por los progenitores que establecen un patrón de expresión diferencial de FTs. La expresión combinada de los genes que codifican estos factores divide la región ventral del tubo neural en dominios discretos, cada uno de los cuales es responsable de la especificación posterior de diferentes subtipos de neuronas motoras e interneuronas (Fig. I.2) (Cohen et al., 2013). Muy recientemente, algunos trabajos están poniendo en cuestión que el mecanismo de acción a distancia de los morfógenos sea través de su difusión

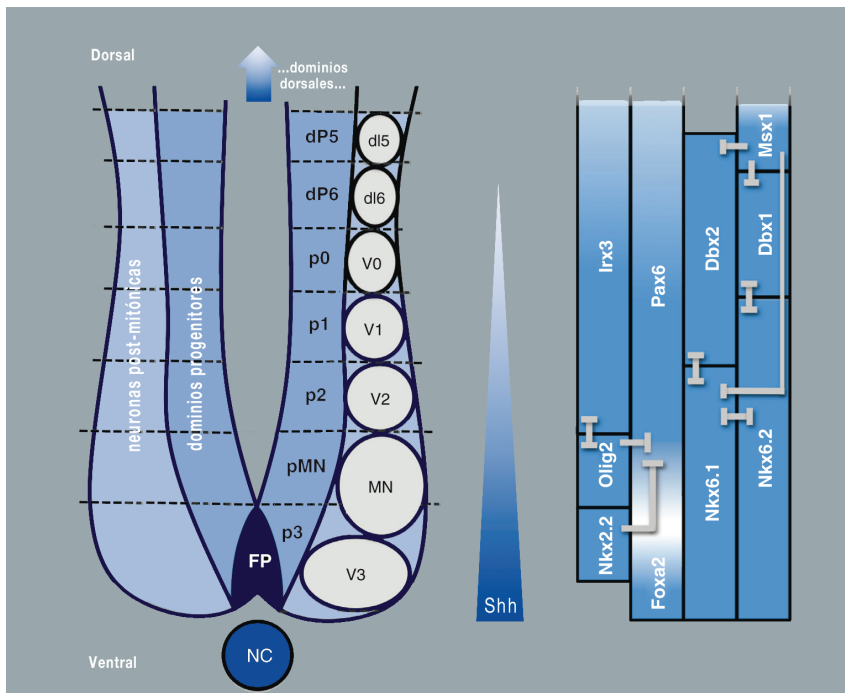


Figura I.2. Localización de los diferentes dominios de células progenitoras en el tubo neural

Sonic Hedgehog (Shh) producido en la notocorda (NC) y la placa suelo (FP *del inglés floor plate*) un patrón de dominios discretos de progenitores a lo largo del eje dorsal-ventral. Las células de cada dominio progenitor diferenciarán, posteriormente, en diferentes subtipos celulares de neuronas post-mitóticas. El destino celular de estos dominios progenitores se especifican por la combinatoria de los patrones de expresión de FTs. Estos factores están conectados por interacciones represivas- algunas de las cuales se muestran en el panel derecho- para formar una red transcripcional. Adaptado de (Cohen et al., 2013).



[ver, por ejemplo (Guerrero and Kornberg, 2014; Sanders et al., 2013)], e incluso que algunos de ellos realmente actúen a distancia (Alexandre et al., 2014). Todos estos trabajos ponen de manifiesto hasta qué punto el control del desarrollo mediado por moléculas secretables es esencial, y cómo de lejos estamos de tener una visión acertada de sus mecanismos de acción.

La caracterización de muchos de estos genes de desarrollo y sus productos en diferentes organismos ha llevado al descubrimiento del carácter pleiotrópico de muchos de ellos, en especial, de aquellos que codifican para las vías de señalización. Así, una señal puede resultar en diferenciación celular en una determinada región, puede influir en otro tipo celular la velocidad de mitosis y en un tercer contexto activar el programa de muerte celular. Por ejemplo, la vía de Wg muestra este carácter pleiotrópico a lo largo del desarrollo de *Drosophila*. Durante las fases tempranas Wg es requerido para organizar la polaridad de los segmentos; después, en el ectodermo embrionario para la formación de los discos imaginales de ala y pata; días posteriores en el territorio del ala de la larva para organizar la polaridad dorso-ventral, inducir proliferación y estructurar los órganos sensoriales; y finalmente, como organizador de polaridad en ojo, pata y otros tejidos [revisado en (Swarup and Verheyen, 2012)].

Por otra parte, los análisis genéticos comparativos realizados en una amplia representación de organismos ha puesto en evidencia el alto grado de conservación de gran parte de los genes implicados en el desarrollo. Uno de los ejemplos más recurrentes que ilustran esta situación es el del gen Pax6. El laboratorio de Walter Gehring demostró hace dos décadas que los efectos de la enfermedad genética humana Aniridia, la enfermedad genética en ratones Small eyes y la mutación en *Drosophila* conocida como *eyeless* (*ey*), las cuales afectan al desarrollo de los ojos, eran provocadas por mutaciones en el mismo gen, el gen Pax6/*ey* (Quiring et al., 1994).

### Las regiones cis-reguladoras y las redes de regulación génica

Este alto grado de conservación de los genes regulatorios y de señalización, así como el carácter pleiotrópico de muchos de ellos, hace que el éxito del avance del programa de desarrollo de cada organismo resida en las instrucciones que determinan cuándo y dónde se regula la actividad de un gen determinado, activando o reprimiendo su expresión. Estas instrucciones de control transcripcional, son conjuntos de secuencias de DNA que sirven de secuencias diana para los FTs codificados por los genes selectores y por los genes efectores de las vías de señalización. Estas regiones de DNA, o módulos *cis*-reguladores (CRMs *del inglés cis-regulatory modules*) contienen sitios de unión para FTs que actúan de manera positiva (“activación”) o negativa (“represión”) para fijar los límites donde la expresión se puede producir. Así, cada CRM produce un patrón espacio-temporal



específico y la combinación de diferentes módulos origina patrones complejos de expresión aportando mayor resolución al destino final de una célula (Davidson, 2001). Dado que cada módulo es regulado por varios FTs y cada FT interacciona con varios módulos es posible representar los patrones de expresión génica como redes que conectan estas interacciones, donde los nodos de la red son los genes que codifican estos FTs o componentes de las vías de señalización y sus CRMs (Davidson, 2001).

Las redes de regulación génica (RRG) son mapas lógicos, cuya arquitectura revela características difíciles de apreciar a otro nivel de análisis y permite profundizar en las propiedades de cada sistema de control. El conocimiento actual sobre estas RRGs es escaso y, por tanto, es pronto para realizar análisis comparativos. Sin embargo, algunas características se han observado de manera recurrente en diferentes contextos de desarrollo, como son los bucles de retroalimentación positivos, los cuales dirigen circuitos estables de diferenciación celular; y la represión transcripcional para excluir un estado regulatorio de un dominio espacial concreto [revisado en (Davidson et al., 2003; Levine and Davidson, 2005; Davidson and Erwin, 2006)].

Las RRGs representan, por tanto, las conexiones funcionales entre los genes que codifican componentes de las vías de señalización y FTs y las secuencias reguladoras que controlan su expresión, actuando como procesadores de la información de la célula y su entorno. Conocer la arquitectura de estas RRGs en los procesos de especificación celular se ha convertido en una herramienta muy potente para intentar comprender la evolución del plan corporal de los animales, bajo la premisa de que los cambios evolutivos en estas RRGs deben ser, en gran medida, la base de la diversidad morfológica encontrada en el reino animal. Así, en esta tesis nos propusimos analizar la RRG que controla el proceso de especificación de la cabeza dorsal de *Drosophila*, la cual deriva del disco de ojo-antena (DOA). La relativa simplicidad del sistema lo convierte en un modelo ideal para estudiar este tipo de procesos en detalle.

## 2.- El disco de ojo-antena de *Drosophila* como modelo de análisis de las RRGs que controlan diferentes destinos celulares

### *Breve introducción a *Drosophila melanogaster**

---

Varias características hacen de *Drosophila* un organismo modelo ideal de estudio: es fácil de cultivar y se pueden mantener diferentes cepas mutantes en un espacio reducido; tiene un número pequeño y manejable de cromosomas (un par de cromosomas sexuales y tres pares autosómicos); y su ciclo de vida es considerablemente corto. Cuando se cultivan a 25°C (temperatura estándar) el desarrollo de

una única célula fecundada hasta formar el adulto tarda 10 días. Durante estos 10 días de desarrollo, la mosca pasa por tres estadios fundamentales: embrionario, larvario y pupa (Fig. I.3A).

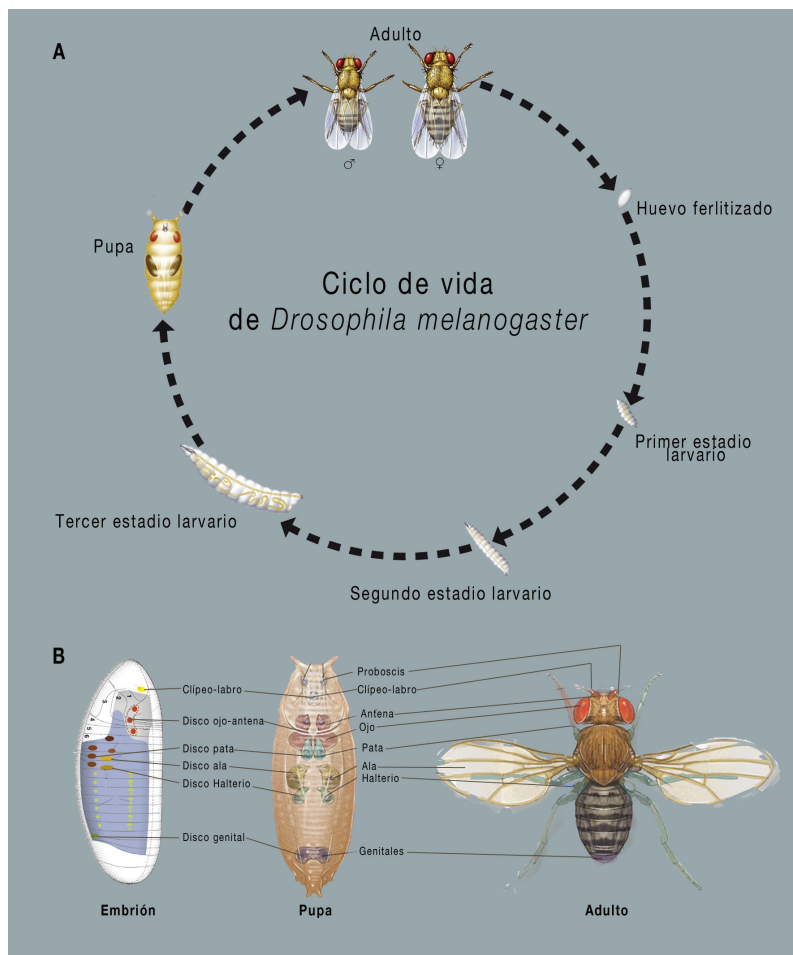


Figura I.3. Ciclo de vida y desarrollo de *Drosophila*

(A) Ciclo de vida de *Drosophila*. (B) Localización de los primordios que dan lugar a las principales estructuras que definen el plan corporal de *Drosophila*.

Una vez fertilizado, el embrión se desarrolla en el interior del huevo durante aproximadamente un día (a 25°C) hasta su eclosión como larva. La larva se alimenta y crece principalmente por poliploidización durante tres fases larvarias (L1-L3). Al final de L3, la larva deja de alimentarse y se fija en un punto seco para pupar. Durante el estadio de pupa tiene lugar la metamorfosis: la mayoría de tejido larvario se histoliza y tiene lugar una reorganización morfológica y fisiológica que culmina con la formación de la mosca adulta o imago. La mayor parte de las

estructuras adultas derivan de primordios formados a partir de invaginaciones en la epidermis embrionaria, las cuales forman pequeños sacos de células que reciben el nombre de discos imaginales (ya que dan origen al imago). Existen diferentes tipos de discos imaginales según la estructura que formarán en el adulto (Fig. I.3B).

El primer uso documentado de *Drosophila* data de 1901 en el laboratorio de William Castle, aunque indudablemente el padre de la investigación en *Drosophila* es Thomas Hunt Morgan. Morgan refinó la teoría de la herencia genética de Mendel conectando la segregación cromosómica al sexo usando para ello la mosca de la fruta. Desde entonces, y con especial énfasis en las últimas décadas, *Drosophila* se ha postulado como un organismo clave para comprender cómo ocurren los procesos de diferenciación celular durante el desarrollo del plan corporal. Además, las comparaciones entre los genomas completos de *Drosophila* y humano han revelado que aproximadamente el 75% de los genes asociados a enfermedades genéticas conocidas hasta la fecha, tienen su contrapartida en el genoma de la mosca, consolidando su importancia como organismo modelo también para la investigación médica.

#### *Origen embrionario del disco imaginal de ojo-antena (DOA) y su desarrollo larvario*

Aunque la formación de la cabeza adulta de *Drosophila* depende de tres pares de discos imaginales, los discos labrales, clipeo-labrales y de ojo-antena, son de estos últimos de donde derivan los principales órganos sensoriales (ojos compuestos, antenas, palpos maxilares y ocelos) y la mayor parte de la cápsula cefálica (Fig. I.4).

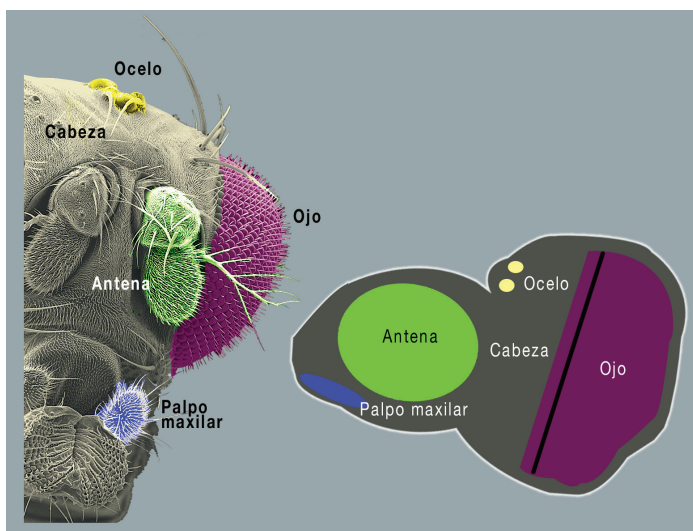


Figura I.4. Origen de las estructuras adultas de la cabeza de *Drosophila*

Imagen de microscopio electrónico de barrido de una cabeza adulta de *Drosophila*. Las diferentes estructuras adultas están marcadas siguiendo el mismo código de color que los primordios en el DOA, donde aparecen los límites de los primordios. Adaptado de (Dominguez and Casares, 2005).



El DOA invagina a partir del extremo posterior del saco dorsal, en la región anterior del embrión y comprende la fusión de, al menos, seis segmentos diferentes: labral, antenal, intercalar (segmentos pre-orales), mandibular, maxilar y labial (segmentos post-orales), además de una región no segmentada, el acron (Jürgens et al., 1986). Durante los tres estadios larvarios el disco crece principalmente por proliferación formando dos capas epiteliales. Los primordios de los diferentes órganos se especifican en uno de los epitelios, el epitelio principal; mientras que la otra capa, el epitelio peripodial, participa en la fusión y eversión de los discos durante la metamorfosis (Friston and Friston, 1975; Pastor-Pareja et al., 2004). La expresión y función de los genes implicados en el desarrollo de los diferentes órganos del DOA se conectan en un modelo de restricción progresiva y subdivisión gradual que permite la especificación de los diferentes primordios (Domínguez and Casares, 2005).

### *Establecimiento de los diferentes primordios en el DOA: dinámica de expresión de los genes selectores y de señalización*

Durante el primer estadio larvario, el DOA expresa de manera uniforme *ey* y *twin of eyeless* (*toy*), dos genes Pax6 parálogos que codifican para FTs y que actúan como genes selectores de ojo [revisado en (Gehring, 2002)]. *Toy* actúa corriente arriba de *Ey* induciendo su expresión y, como resultado, ambos genes se expresan con patrones muy similares (Czerny et al., 1999). Además de *ey* y *toy* también se expresa, en todas las células del disco, el FT de la clase TALE, *homothorax* [*hth*; (Rieckhof et al., 1997; Pai et al., 1998)].

Durante el segundo estadio larvario una serie de cambios resultan en la primera definición molecular de los territorios de ojo y antena. Primero, la expresión de *ey/toy* se retrae hacia los dos tercios posteriores del disco, mientras que la expresión del FT con homeodominio *cut* se activa en el tercio anterior. Esta expresión complementaria *Ey/Toy* y *Cut* marca los futuros territorios de ojo y antena, respectivamente (disco de ojo y de antena de aquí en adelante). La activación de otro FT, *Distalless* (*Dll*), dentro del dominio de expresión de *cut*, lidera la co-expresión de *Dll* y *Hth*, los cuales especifican el destino celular de la antena (Casares and Mann, 1998; Dong et al., 2001) (Fig. 1.5A).

Mientras ocurre la separación de los territorios de ojo y antena la expresión del factor nuclear *eyes absent* (*eya*), activado por *Ey*, comienza en la región posterior del disco de ojo. *Eya* es el primero de una serie de factores nucleares que se expresan dentro de la futura retina y que colectivamente se conocen como los genes determinantes de la retina (GDRs) [revisado en (Pichaud et al., 2001)]. Este grupo incluye los genes homólogos de la familia *Six*, *sine oculis* [*so*; *Six1/2*; (Cheyette et al., 1994a; Serikaku and O'Tousa, 1994)] y *Optix* [*Six3/6* (Toy et al., 1998; Seimiya and Gehring, 2000)], junto con el factor nuclear *dachsund* [*dac*;

(Mardon et al.)). Todos estos genes se requieren para el inicio de la diferenciación de la retina y forman una red de interacciones mutuas esencial para determinar la competencia del disco de ojo (Fig. I.5B).

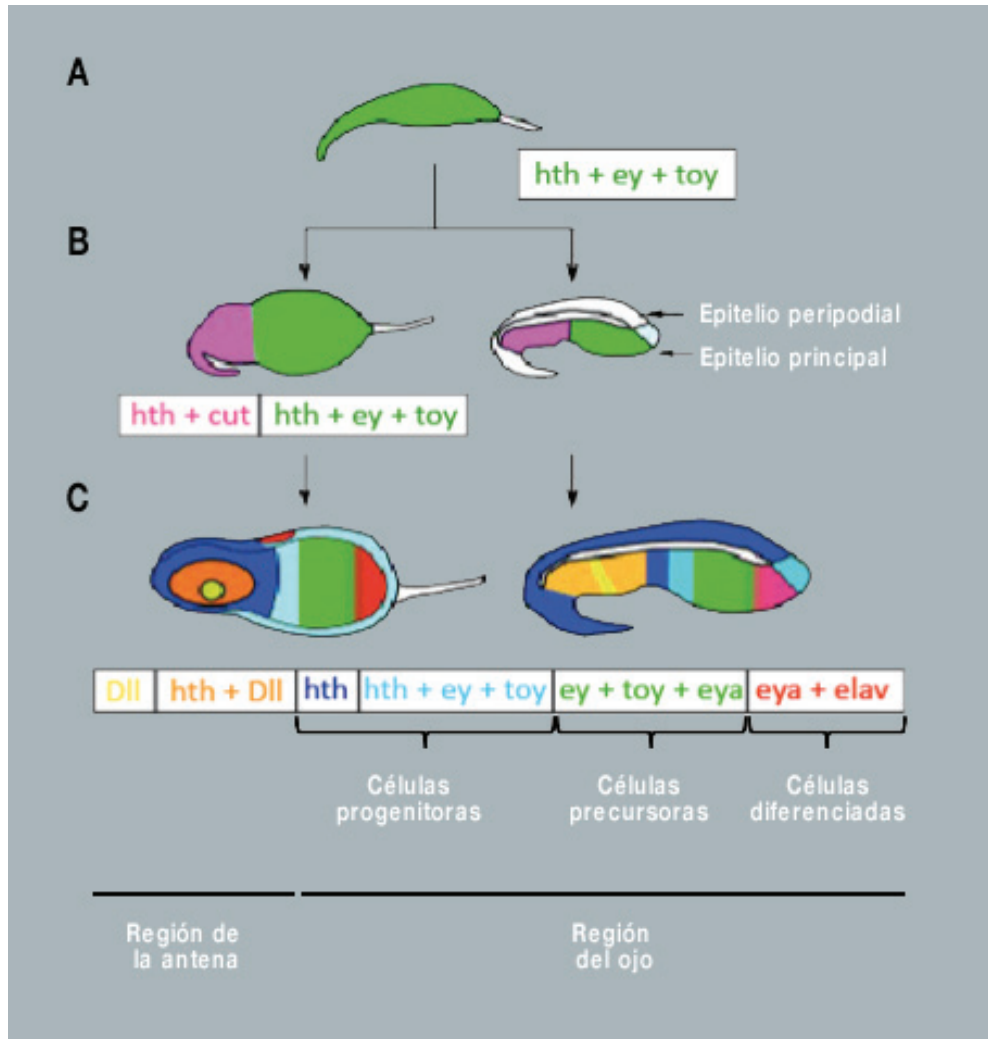


Figura I.5. Modelo de la restricción progresiva de las distintas estructuras que derivan del DOA

(A-C) Esquema del proceso de morfogénesis en el DOA. Se muestra vista frontal (panel izquierdo en B y C) y lateral (panel derecho en B y C) de la evolución de los patrones de expresión claves para el establecimiento de los diferentes primordios durante el primer (A), segundo (B) y tercer (C) estadio larvario. Adaptado de (Domínguez and Casares, 2005).

Las moléculas de señalización Wg (Cadigan and Nusse, 1996) y Decapentaplegic [Dpp; miembro de la familia BMP-4; (Heberlein et al., 1993)] también se expresan en la región anterior y posterior del DOA, respectivamente (Kenyon et al., 2003), desde el comienzo de la vida larvaria y son determinantes para



el establecimiento progresivo de los diferentes primordios. Tanto las moléculas Wg desde la región anterior como las moléculas Dpp desde la región posterior serían secretadas. Sin embargo, el pequeño tamaño del disco al comienzo del desarrollo permitiría que todas las células del disco leyese las dos señales. A medida que el tejido crece, las células del dominio posterior dejarían de recibir Wg, permitiéndose así la activación de Eya, que pone en funcionamiento la cascada de diferenciación de la retina. Las células del dominio anterior, por su parte, no recibirían Dpp, lo que permite la activación de la expresión de *hth* por Wg y la consecuente especificación de la antena [revisado en (Domínguez and Casares, 2005)].

A finales del segundo estadio, una vez se ha establecido la restricción entre el disco de antena y el disco de ojo, la expresión restringida de Wg en el margen anterior del disco de ojo, permite la especificación de la cápsula cefálica (Fig. 1.5C), mientras que *dpp*, expresado en el surco morfogenético (SM), guía el proceso de diferenciación de la retina (Heberlein et al., 1993; Domínguez and Hafen, 1997; Curtiss and Mlodzik, 2000). Además, ambas vías se reprimen mutuamente, delimitándose, de esta forma, el rango de acción de sus respectivas señales y, como consecuencia el tamaño de los primordios.

Al comienzo del tercer estadio la expresión restringida de Wg en la región anterior-dorsal permite la especificación de la cabeza dorsal, mediante la activación del gen selector *orthodenticle* [*otd*; ver Capítulo 2; (Royet and Finkelstein, 1997)]. De este primordio derivan los ocelos, tres ojos simples que sirven para mantener la estabilidad de la mosca durante el vuelo y para la detección de cambios repentinos de intensidad de la luz [revisado en (Krapp, 2009)].

### *El sistema visual de Drosophila: el ojo compuesto y el ocelo*

---

El sistema visual adulto de *Drosophila*, por tanto, está formado por dos conjuntos de ojos: los ojos compuesto y los ocelos u ojos simples. Los ojos compuestos están formados aproximadamente por 800 unidades ópticas individuales llamadas omatidios. Cada omatidio está equipado con 8 células foto-receptoras, 4 células secretoras del cono (lente) y 2 células pigmentarias primarias, encapsuladas todas ellas por células pigmentarias de segundo y tercer orden (Meinertshagen and Hanson, 1993). Cada omatidio recibe la luz de una fracción del campo de visión y el cerebro procesa e integra esta información para formar una única imagen. La morfología del ocelo, en cambio, es mucho más simple que la del ojo compuesto. Cada ocelo está formado por unas 80 células foto-receptoras encapsuladas por una capa de células pigmentarias y cubiertas por una capa de células corneales, las cuales secretan la lente y cubren el área de la retina [revisado en (Friedrich, 2006)] (Fig. 1.6). La posición de los foto-receptores en relación al punto de foco de la lente en los ocelos no permite formar una imagen



definida; sin embargo, tienen una mayor sensibilidad a la luz. Además, su conectividad directa con células del cerebro posterior y la conexión de éstas con sistemas motores, permite a la mosca responder a los cambios de orientación más rápidamente que los ojos compuestos.

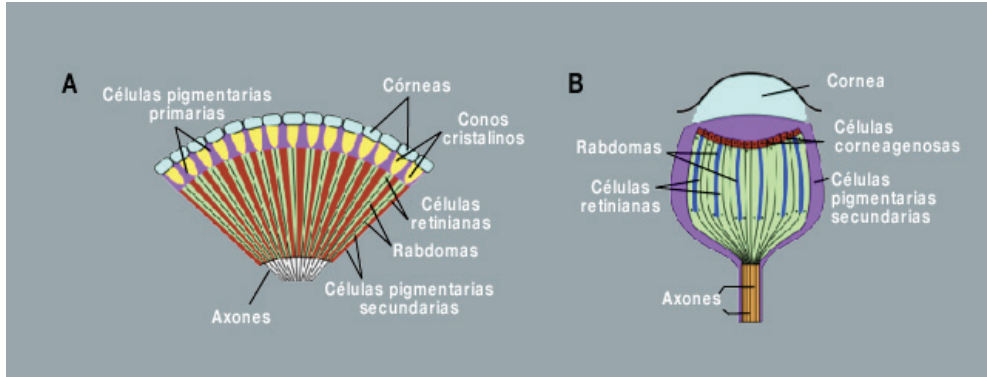


Figura I.6. Morfología del ojo compuesto y el ocelo u ojo simple

(A, B) Vista esquemática de los principales componentes del sistema visual adulto de *Drosophila*, el cual está formado por los ojos compuestos (A) y los ocelos (B).

Ya hemos visto como, a comienzos del tercer estadio, una vez establecido el primordio que formará el ojo compuesto, se inicia la diferenciación de la retina, en el margen posterior del mismo, por la acción sucesiva de Hh y Dpp. Una vez iniciada, la diferenciación de la retina procede como una onda en dirección posterior-anterior. El frente de esta onda de diferenciación viene marcado por una depresión en el epitelio principal, llamada surco morfogenético (SM). De esta manera, las células que se encuentran anteriores al SM se mantienen indiferenciadas y se dividen de forma asincrónica mientras que las células posteriores a él se diferencian [revisado en (Treisman and Heberlein, 1998)]. El avance del SM es dirigido por la acción conjunta de Dpp, expresado dentro del SM, y Hh, expresado posteriormente al surco. La inducción del gen proneural *atonal* (*ato*) por Hh, es el primer paso hacia la definición del foto-receptor R8 (Domínguez and Hafen, 1997; Domínguez, 1999). La expresión de los genes selectores *ey* y *toy*, que inicialmente se expresan en todo el primordio, se reprime en las células diferenciadas y su actividad queda restringida al dominio indiferenciado, anterior al SM (Czerny et al., 1999). En esta población de células indiferenciadas, la co-expresión de *ey* y el FT *hth*, junto con el FT *teashirt* (*tsh*) mantienen a las células en estado proliferativo (Pai et al., 1998; Bessa et al., 2002; Lopes and Casares, 2010).

La especificación de los ocelos, sin embargo, no requiere de la participación de Dpp ni de *ey* (Royet and Finkelstein, 1997; Punzo et al., 2002). Aquí, la activación de los GDRs *eya* y *so* se produce por la acción en paralelo de *toy*, *otd* y la vía de Hh (Royet and Finkelstein, 1996; Blanco et al., 2009; 2010; Brockmann et



al., 2011). A finales del tercer estadio, la expresión de *eya/so* aparece confinada en dos dominios en la región medial del primordio de la cabeza dorsal, en parte, por la acción negativa que *hth* ejerce sobre los GDRs, delimitando así el tamaño de los ocelos.

La diferenciación de los ocelos ocurre, en su mayor parte, durante el proceso de pupación, hecho que ha dificultado su estudio detallado hasta el momento. Durante este estadio se produce la fusión de los dos discos imaginales izquierdo y derecho, de manera que los dos parches anteriores de expresión *eya/so* se fusionan y forman el ocelo anterior (o medial), mientras que los dos parches posteriores se mantienen separados y forman los dos ocelos posteriores (o laterales). El dominio central que separa ambas poblaciones formará, en el adulto, la cutícula interocelar.

La visión general mostrada hasta ahora es que el ocelo y el ojo compuesto de *Drosophila* comparten una RRG básica, en la que se requiere de un gen Pax6 (*toy* en el caso del ocelo y *ey* en el del ojo compuesto) para determinar la competencia de la retina y donde la expresión de los GDRs *eya/so* es inducida, en el territorio competente, por Hh. Sin embargo, son dos tipos muy diferentes de ojo, en función y en estructura. Entonces, ¿dónde yace la diferencia genética? ¿es posible transformar un ojo compuesto en un ocelo, o viceversa, con tan solo algunos cambios genéticos, o la similitud aparente de la red es solo eso, aparente? Con estas preguntas en mente nos propusimos profundizar en el mecanismo que conduce a la especificación de los ocelos durante el tercer estadio larvario.



# Objetivos







El conocimiento de cómo un órgano se especifica, crece y se estructura requiere entender cómo las células integran información posicional (en forma de señales extracelulares) y redes génicas intracelulares. El complejo ocelar de *Drosophila*, el cual deriva de la región anterior-dorsal del disco de ojo-antena, representa un sistema de estudio ideal dada su relativa simplicidad, por un lado, y el avance en la técnicas genéticas que ofrece *Drosophila*, por otro. En esta tesis proponemos explorar la red de regulación que gobierna el proceso de especificación del complejo ocelar (CO) en *Drosophila*, partiendo del conocimiento de que la vía de Hh es determinante para el correcto desarrollo de todo el complejo. Esto quiere decir que, en esta región, Hh controla el destino celular no solo de los propios ocelos, sino también de la cutícula que los separa, la región interocelar. Así, como objetivo concreto en este trabajo planteamos:

Determinación de la red de regulación controlada por Hh que establece los distintos destinos celulares y su distribución espacial en el CO.



# Materiales y métodos







## 1.- Manipulación Genética y cepas de *Drosophila*

### 1.1.- Sistema Gal4/UAS

En esta tesis hemos usado el sistema Gal4/UAS para controlar la expresión de diversos genes en las distintas regiones de la cabeza dorsal (Brand and Perrimon, 1993). En este sistema, la expresión del gen de interés se encuentra controlada por la presencia de secuencias *cis*-reguladoras UAS (*del inglés Upstream Activation Sequence*). La expresión dirigida por estas secuencias requiere la presencia del factor de transcripción Gal4 de levaduras, y por ello su ausencia en las líneas UAS mantiene la transcripción silenciada. Para activar su expresión estas líneas son cruzadas con moscas que expresen Gal4 en un patrón determinado. El resultado en la progenie es la expresión del gen de interés siguiendo un patrón transcripcional de Gal4.

En este estudio hemos utilizado las siguientes líneas UAS:

UAS *ptc*Δloop2GFP [UAS *ptc*DN; (Briscoe et al., 2001)]  
UAS en (Guillén et al., 1995; Tabata et al., 1995)  
UAS Ci (Alexandre et al., 1996)  
UAS *mam*DN (Dominante Negativo) (Kumar and Moses, 2001)  
UAS GFPhth (Casares and Mann, 2000)  
UAS DAXinA2-24 (Willert et al., 1999)  
UAS ECadh(5intra) (Sanson et al., 1996)  
UAS TCFDN (Dominante Negativo) (de Wetering et al., 1997)  
UAS CycE (Lane et al., 1996)  
UAS CycD-cdk4 (Datar et al., 2000)  
UAS STAT92E-GFP (Karsten et al., 2006)  
UAS *yki* (Staley and Irvine, 2010)  
UAS tkvQD (Nellen et al., 1996)  
UAS GFP (Bessa and Casares, 2005)  
UAS *arm* (Pai et al., 1997)  
UAS Hh6.1  
UAS LacZ (Phelps and Brand, 1998)  
UAS OptixS1 (26806 Bloomington Stock Center)  
UAS DERDN (Dominante Negativo) (Freeman, 1996)

Mediante este sistema también se puede dirigir la expresión de RNA de interferencia (RNAi) que inhibe o disminuye la expresión de los genes (Ni et al., 2008). Estas líneas RNAi sintetizan cadenas de RNA complementarias a las cadenas de RNA mensajero sintetizadas por el gen de interés, generándose cadenas dobles que son destruidas por la enzima Dicer, la cual contiene el pro-



pio organismo (Macrae et al., 2006). La fragmentación de estas cadenas dobles de RNA resulta en el bloqueo de la transducción a proteínas y la consecuente pérdida o reducción de su función.

Aquí hemos usados las siguientes líneas UAS RNAi, inducibles por Gal4:

UAS Su(H)RNAi (103597 VDCR)  
UAS DIRNAi (28032 VDCR)  
UAS SerRNAi (27172 VDCR)  
UAS hthRNAi (12763 VDCR)  
UAS otdRNAi (29342 Bloomington Stock Center)  
UAS enRNAi (35697 Bloomington Stock Center)  
UAS OptixRNAi (31910 Bloomington Stock Center)  
UAS toyRNAi (15919 VDCR)  
UAS mirrRNAi (50133 VDRC)

Para dirigir la expresión de estas líneas UAS hemos utilizado las siguientes líneas Gal4: *oc2Gal4*, que se expresa en la región antero-dorsal del disco de ojo-antena (Blanco et al., 2009) ; *wgGal4* y *hhGal4* (Tanimoto et al., 2000) los cuales reproducen el patrón de expresión de los genes *wg* y *hh*, respectivamente, a lo largo del desarrollo de *Drosophila*; *86c11Gal4* que se expresa en las regiones laterales de la cabeza dorsal (Bloomington Stock Center); *NP2631Gal4* cuya expresión ha sido asociada al gen *Optix* y reproduce parte del patrón total de *Optix*, incluyendo la expresión medial en la región anterior de la cabeza (Kioto Stock Center); y *wg2.11Gal4* que recapitula el patrón de *wg* en la región anterior-dorsal del disco de ojo (Pereira et al., 2006) .

Los cruces se incubaron a 25°C, excepto con las líneas RNAi que se mantuvieron a 29°C para aumentar la penetrancia de los *knock-downs*.

## 1.2.- Análisis Clonal

### Clones de pérdida de función

Otro sistema adaptado de levaduras a *Drosophila* es el sistema FLP/FRT (Golic and Lindquist, 1989; Xu and Rubin, 1993). Este sistema permite la generación de clones celulares de un genotipo determinado detectables mediante marcadores mediante recombinación mitótica, dentro de un tejido que es normal (i.e. heterocigótico para la mutación utilizada). Este procedimiento permite la generación de animales mosaico en diferentes estadios de desarrollo, permitiendo superar la fase de letalidad embrionaria que producen muchas mutaciones en





homocigosis. Este método se basa en la recombinasa de levaduras, la flipasa (FLP), la cual actúa sobre sitios específicos del DNA, los llamados sitios Flipase Recombination Target (FRT). Tanto la FLP (expresado bajo el control de, por ejemplo, un promotor de choque térmico) como los sitios FRT se introducen en el genoma de *Drosophila* a través de transgénesis mediada por el elemento P. Cuando los sitios FRT se encuentran en la misma localización cromosómica en cromosomas homólogos, la FLP los reconocerá y permitirá la recombinación entre los brazos de los cromosomas.

Para realizar los clones de pérdida de función de *en* de esta tesis, indujimos la recombinación mitótica, por choque térmico a 37°C durante 45 minutos, en la descendencia de hembras *ywhsflp122; FRT42D {Ubi-GFP}/CyO* y machos *w; Df(2R)EnEFRT42D/CyO*. Los clones en el disco imaginal pueden distinguirse por la falta de expresión de GFP (*del inglés Green Fluorescent Protein*), que se activa de forma ubicua bajo el control de secuencias reguladoras del gen *ubiquitin* (transgen *Ubi-GFP*) (Davis et al., 1995).

### Clones de ganancia de función

Cuando los sitios FRT se localizan como repeticiones directas en el mismo brazo cromosómico la recombinación mediada por la flipasa produce la escisión del fragmento de DNA contenido entre los sitios FRT (Struhl and Basler, 1993).

En este estudio los clones de ganancia de función se realizaron cruzando hembras *hsflp122; act>y+>Gal4, UAS-GFP* con machos *UAS-en* o *UAS-hth*. Los clones se indujeron en la progenie a las 80-100 hpf mediante choque térmico a 35,5°C durante 30 minutos.

### 1.3.- Sistema G-TRACE

El sistema Gal4 technique for real-time and clonal expression (G-TRACE) combina los sistemas Gal4/UAS y FLP/FRT y reporteros fluorescentes para generar clones celulares que proporcionan información espacial, temporal y genética. La clave de este sistema reside en que la iniciación de la expresión del gen reportero es dependiente del Gal4, mientras que el mantenimiento de su expresión no (Evans et al., 2009), permitiendo seguir el linaje del gen (GFP) y la expresión actual (RFP).

Además de la línea *HhGal4* (Tanimoto et al., 2000), se usaron las siguientes líneas Gal4: *22E03*, *30C12*, *30E04*, *30A04*, *30F12* y *29G03*, descritas en el proyecto Janelia Farm y depositadas en el centro de Bloomington (<http://flystocks>).



bio.indiana.edu/); y las líneas VT058864, VT058867, VT058868 y VT058870 obtenidas del centro de Viena (<http://stockcenter.vdrc.at/control/main>). Todas estas líneas están descritas como secuencias reguladoras putativas del gen *otd*.

## 1.4.- Otras líneas

### Líneas reporteras

La capacidad de un enhancer de regular la expresión de los genes ha sido utilizada en biología del desarrollo para encontrar nuevos enhancers y los genes regulados por ellos. Para hacerlo, se produce una trampa de enhancers, que consiste en un gen reportero (como el gen *lacZ* de *E. coli*) fusionado a un promotor relativamente débil. Este promotor no iniciará la transcripción del gen reportero sin la ayuda de un potenciador (O’Kane and Gehring, 1987). Esta trampa de *enhancers* es introducida o movilizada dentro del genoma dentro de un trasposón, generalmente de tipo P, y su integración es al azar (aunque los trasposones P tienen sitios de integración preferentes, o “hotspots”). Si el gen reportero es expresado, significa que el reportero ha caído dentro del dominio de un potenciador activo. Mediante el aislamiento de esta región activada del genoma, puede ser descubierto el gen normal que es activado. Otras líneas reporteras se obtienen mediante la fusión de *enhancers* conocidos a un promotor débil que controla el gen reportero. En este caso, la actividad detectada corresponde exclusivamente a la controlada por el *enhancer* utilizado. En esta tesis hemos utilizado las siguientes líneas reporteras: (todas ellas fusionadas al gen LacZ): *hhP30* (referido como *hhZ*; FlyBase); *enXho25* (referido como *enZ*; FlyBase), *ciZ* (Schwartz et al., 1995), *eyZ* (Xu et al., 1999), *wgZ* (Kassis et al., 1992), *oc7Z* (Blanco et al., 2009), *mirr880Z*, *lro-rF209* (Gomez-Skarmeta et al., 1996), *SerV1.9-Z* (Bachmann and Knust, 1998), *Fng-rF584* (Grammont and Irvine, 2001) y *DIZ* (Haenlin et al., 1994), todas ellas descritas en FlyBase.

Cuando el sistema se basa en la inserción de un reportero (como GFP) en las proteínas expresadas desde su locus endógeno, se denomina trampa de proteínas. Este método permite el estudio de la distribución subcelular de las proteínas codificadas por el *loci* ‘atrapado’ (Morin et al., 2001). Aquí, hemos usado la trampa de proteínas *GFP::ptc*, que reproduce el patrón de distribución de la proteína Patched (Buszczak et al., 2007).

### Alelos mutantes

Para el ensayo de la robustez del sistema mediante perturbaciones por fluctuación térmica se usaron dos cepas de referencia, *Oregon-R* y *w1118*, y las cepas



heterocigóticas para alelos mutantes de los genes *patched* [*ptc*: *yw*; *FRT42D ptcS2/CyO* (Bloomington 6332)], *smoothened* (*smo*: *w*; *smo3 FRT40A/CyO*), *cubitus interruptus* (*ci*: *ywhsflp*; *Ci+* *FRT40A/CyO*; *Ci94*) y Notch (N: *wch2,N243-39/FM4*, *B+*) todas ellas descritas en FlyBase.

## 2.- Inmunohistoquímica y Microscopía

### *Inmunofluorescencia en discos imaginales*

---

Los discos imaginales de ojo-antena se disecaron de larvas de tercer estadio en PBS a 4°C. Utilizando unas pinzas, los discos se desprendieron del resto de tejidos mediante la tracción de la mandíbula (estructura a la que se encuentran unidos). La muestra se fijó con agitación en formaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBT (PBS + 0,1% Triton X-100), los discos se incubaron con el anticuerpo primario durante 2 horas a temperatura ambiente o a 4°C toda la noche. Tras retirar y lavar con PBT los restos del anticuerpo primario de la muestra, se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados Alexa Fluor -488, -568, -647 apropiados, en una dilución 1/1000, durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras se montaron sin la mandíbula en glicerol al 50% en PBS y guardaron a 4°C en oscuridad para su posterior análisis.

Para realizar la tinción extracelular de Wg los discos se marcaron con el anticuerpo primario a una concentración 1/25 durante 4 horas a 4°C. Tras realizar dos lavados con PBS, se fijaron por agitación a 4°C durante 40 minutos en formaldehído al 4% y se procedió con el marcaje con el anticuerpo secundario siguiendo el protocolo convencional.

### *Inmunofluorescencia en embriones*

---

Huevos depositados durante toda la noche se decorionaron en lejía comercial diluida al 70% y se fijaron a temperatura ambiente en una mezcla 1:1 de formaldehído al 4% y n-heptano durante 20 minutos. Los embriones se desvitelinizaron por agitación en una mezcla de metanol y heptano y tras 3 lavados con metanol, primero, y 2 en PBT (PBS + 0,1% Tritón X-100), se bloquearon y tiñeron en PBT + BSA al 1%. Para el revelado empleamos anticuerpos secundarios conjugados a Alexa Fluor -488, -568, -647 de Invitrogen, diluidos 1/200 en PBT + BSA al 1%. Los embriones fueron montados para su análisis en 50% de glicerol y PBS y guardados en oscuridad para preservar la fluorescencia.



Los anticuerpos primarios usados en este estudio así como su dilución final y procedencia se detallan a continuación:

Anticuerpo	Concentración	Especie	Procedencia
$\alpha$ -eya 10H6	1/400	Ratón	Hybridoma Bank
$\alpha$ -en 4D9	1/200	Ratón	Hybridoma Bank
$\alpha$ -so	1/1000	Cobaya	Ilaria Rebay
$\alpha$ -Ci <sup>A</sup> 2A1	1/5	Rata	Hybridoma Bank
$\alpha$ -ptc	1/100	Ratón	Isabel Guerrero
$\alpha$ -hth	1/2000	Cobaya	Richard Mann
$\alpha$ -otd	1/1000	Cobaya	Tiffany Cook
$\alpha$ -Pmad	1/100	Cobaya	Ed Laufer
$\alpha$ -wg 4D4	1/25	Ratón	Hybridoma Bank
$\alpha$ -Optix	1/500	Conejo	Francesca Pignoni
$\alpha$ - $\beta$ galactosidasa	1/1000	Conejo	Cappel
$\alpha$ - $\beta$ galactosidasa	1/1000	Cabra	Hybridoma Bank

Todas las imágenes se tomaron con un microscopio confocal Leica SP2-AOBS y fueron procesadas con ImageJ, para realizar las proyecciones sobre el eje Z, y con Adobe Photoshop CS5.

### Tinción X-gal

Cabezas adultas o discos de tercer estadio se fijaron por agitación en glutaraldehído al 1% en PBS durante 2 minutos a temperatura ambiente. Tras dos lavados con PBT se añadió la siguiente solución ( $V_F$  500  $\mu$ L):

25  $\mu$ L K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]\*3H<sub>2</sub>O 100mM  
 25  $\mu$ L K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 100mM  
 12,5  $\mu$ L de solución X-gal al 8% en DMS  
 1  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>  
 465  $\mu$ L PBT

Las muestras en solución se mantuvieron a 37°C hasta su total revelado. Tras dos lavados en PBT las cabezas adultas se montaron en solución de Hoyer's y ácido acético 1:1, mientras que los discos imaginales se montaron en 50% glicerol en PBS (Casares and Mann, 2000).



Todas las imágenes de las preparaciones se realizaron con un microscopio Leica DM500B y se trataron con Adobe Photoshop CS5.

### 3.- Preparación de cutículas adultas y larvarias

#### Cutículas adultas

Tanto la región dorsal de la cabeza como la proboscis y clipeo-labro se diseccionaron en PBS de adultos o faratos tardíos. Las estructuras se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente en una mezcla 1:1 de solución de Hoyer's y ácido acético (1:1) y se montaron usando la misma solución. La muestra se incubó no menos de 10 horas a 80°C y se sellaron los laterales con laca.

#### Cutículas larvarias

Muestras de 24 horas de edad se decorionaron en lejía comercial diluida al 70% y se desvitelinizaron con un tratamiento de metanol y heptano en agitación. Se recogieron las cutículas que se recuperan en la fase inferior y tras 3 lavados con metanol seguidos de 2 lavados con agua MilliQ y PBT 0,1% se montaron usando el medio de Hoyer's-ácido láctico (1:1). Las cutículas se incubaron a 60°C durante 2 días para aclarar los tejidos internos.

Las imágenes de las preparaciones se realizaron con un microscopio Leica DM500B y se trataron con Adobe Photoshop CS5.

### 4.- Cuantificaciones y perfiles de expresión

#### Perfiles de expresión

Los patrones de expresión se realizaron midiendo la intensidad de la señal correspondiente en tres discos independientes con el programa ImageJ. A los valores obtenidos se les realizó la media y los resultados se representaron haciendo uso de Microsoft Excel.

#### Ensayo de fluctuación térmica

Para realizar el ensayo de perturbación térmica seguimos el protocolo descrito por (Li et al., 2009). Se recogieron embriones durante 24 horas a 25°C y se dejaron crecer a la misma temperatura 24 horas más. Entonces las larvas se



sometieron a cinco ciclos de temperatura (1.5 horas a 18°C + 1.5 horas a 31°C) y se mantuvieron a 25°C hasta su eclosión. Como control las mismas líneas se mantuvieron a 25°C durante todo el desarrollo.

### *Medición del Complejo Ocelar*

---

Las medidas del CO en cabezas adultas se realizaron con el programa ImageJ. Se midió los ejes mayores del ocelo anterior y posterior y la distancia entre ambos ocelos como medida de la cutícula interocelar. La muestra fue de 10 adultos para el ocelo anterior y 20 para el ocelo posterior y región interocelar. Los datos se representaron con el programa R.

# Resultados







# CAPITULO 1

## Especificación del complejo ocelar

Como hemos visto en la introducción, la cabeza adulta de *Drosophila* se forma a partir de la fusión de los dos discos imaginales de ojo-antena, obteniéndose de esta fusión una estructura lateralmente simétrica. En la región dorsal, el exoesqueleto o cutícula está subdividido en tres dominios morfológicamente distintos [Fig. 1.1A; (Royet and Finkelstein, 1995; 1996)]. A lo largo del eje lateral-medial, éstos son: (1) cutícula orbital o subdominio lateral, situado adyacente a los ojos compuestos y que contiene un conjunto característico de macroquetas; (2) la frente o subdominio mediolateral, distinguible debido a que está formado por un conjunto de surcos paralelos y; (3) el complejo ocelar o región medial. Es en esta región donde se encuentran los ocelos: uno anterior y dos posteriores. Los ocelos están separados por una porción de cutícula (región interocelar, RIO) muy parecida en apariencia a la cutícula orbital. Dicha región alberga un conjunto de cerdas sensoriales, dos macroquetas anteriores y dos posteriores (quetas post-verticales), además de un grupo de microquetas localizadas en la parte central (microquetas interocelares).

La zona anterior de la región dorsal viene limitada por el ptilinum, órgano dilatante que permite la emergencia del adulto desde el pupario (Whitten, 1963). La región posterior, por su parte, viene limitada por la región occipital.

El papel que desempeña Hh y su vía de señalización en la especificación del complejo ocelar ha sido descrito previamente por Royet y Finkelstein (Royet and Finkelstein, 1996). Estos autores generaron moscas homocigóticas para una mutación termo-sensible de *hh* y sólo durante L3 las transfirieron a la temperatura restrictiva. Lo que observaron fue que los adultos perdían las estructuras del complejo ocelar (CO) que era reemplazado por cutícula de tipo adyacente, la frente. Un fenotipo similar se observa en moscas que expresan una forma dominante negativa del receptor de la vía, *ptc* (*ptcΔloop2*; Fig. 1.1B; (Briscoe et al., 2001). Esta pérdida completa de la región indica que durante el tercer estadio larvario

Hh es necesario para la especificación de, al menos, dos tipos de tejidos, el ocelo y la cutícula interocelar.

Ya hemos hablado con anterioridad sobre el papel de los genes determinantes de la retina (GDR), *eya* y *so*, en la formación de los ocelos (ver Introducción) (Cheyette et al., 1994b; Serikaku and O'Tousa, 1994; Pignoni et al., 1997; Zimmermann et al., 2000; Blanco et al., 2009; 2010; Brockmann et al., 2011) y de cómo su expresión depende tanto de su propio bucle de retroalimentación positiva como de moléculas Hh que son secretadas desde las células de la futura RIO, su dominio de expresión en estadio L3 tardío (Pauli et al., 2005; Blanco et al., 2009; Brockmann et al., 2011). Sin embargo, existe menos información referente al mecanismo de regulación por el que un único dominio de expresión de *hh* es capaz de generar el patrón final, es decir, dos áreas de expresión de *eya* y *so*, precursoras de los ocelos, a ambos lados de la región intermedia, precursora de RIO, o aOC-RIO-pOC (Fig 1.1C).

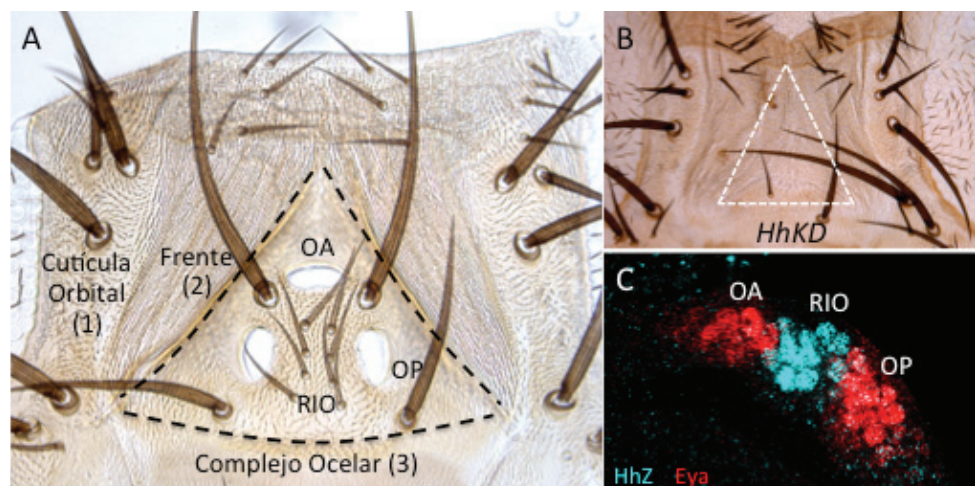


Figura 1.1. La vía de Hh y el desarrollo de la región dorsal de la cabeza.

(A) La región dorsal de la cabeza se divide en tres dominios, de lateral a medial: (1) cutícula orbital; (2) la frente y (3) el complejo ocelar, región central de la cabeza en forma triangular y que alberga los ocelos y la región interocelar (RIO). (B) Cabeza de *Drosophila* de adultos con la vía de Hh bloqueada (*oc2>ptcΔloop2GFP; HhKD*). En esta situación no se desarrollan los elementos del complejo (triángulo). (C) Región ocelar de un disco L3 tardío de larvas *hhZ*. El dominio de expresión de la β-galactosidasa (azul; *hhZ*) marca la futura RIO, la cual está flanqueada por dos dominios de expresión de *Eya* (rojo), los futuros ocelos anterior (OA) y posterior (OP). En éstas y las siguientes figuras anterior está en la parte superior en las cabezas adultas y a la izquierda en los discos imaginales.

### 1.1.- *engrailed* (*en*) como gen diana de Hh durante la formación del complejo ocelar

En el disco de ala la expresión de *hh* en el compartimento posterior depende de *en*. Sin embargo, en este disco la propia vía de Hh induce expresión de *en* en las células del compartimento anterior (A) inmediatamente adyacentes al borde anterior-posterior (AP) como gen diana de baja sensibilidad (Guillén et al., 1995; Ohlmeyer and Kalderon, 1998; Méthot and Basler, 1999). Dado que la expresión de *en* aparece después de la de *hh* y que ambos genes se expresan con patrones casi solapantes [Fig. 1.2A; (Yorimitsu et al., 2011; Royet and Finkelstein, 1996; 1996)], decidimos comprobar si Hh estaba involucrado en la activación de *en*. Para resolver esta cuestión analizamos la expresión de *en* en discos que tenían la vía de Hh bloqueada específicamente en la región ocelar (*oc2>PtcΔloop2*; en adelante '*HhKD*', del inglés *Hh knockdown*) y vimos que apenas se podían detectar células que expresasen *en* (Fig. 1.2B). La pérdida de expresión de *so* confirmaba la eficiencia del *knock-down*. Este resultado nos sugirió que *en* actuaba como gen diana de la vía de Hh. El hecho de que en discos más tempranos no encontrásemos expresión de *en* (Fig. 1.2C-C"), a pesar de que la expresión de *eya* ya se hubiese activado, nos hizo pensar que, como en el caso del disco de ala, *en* se comportaba como gen diana de baja sensibilidad.

### 1.2.- Dinámica de la expresión de *eya* y la vía de Hh durante el desarrollo ocelar

El siguiente paso para intentar comprender cómo se generaba el patrón (aOC-RIO-pOC) fue analizar la expresión de *ptc* (receptor de Hh) y *eya* (gen diana de Hh) a lo largo de L3. Para monitorizar la expresión de Ptc utilizamos una línea GFP::*Ptc* (trampa de proteínas) cuya señal se recogió directamente, mientras que para Eya usamos un anticuerpo comercial (ver Materiales y métodos). El resultado nos reveló que durante las fases tempranas Ptc se expresaba en un único dominio a lo largo de todo el territorio ocelar mientras que apenas se detectaban células positivas para Eya (Fig. 1.3A). En un estadio inmediatamente posterior, la expresión de Eya se detectó en un dominio constante y uniforme semejante al de Ptc::*GFP* (Fig. 1.3B). En las últimas etapas de L3 la expresión tanto de Ptc como de Eya se atenuó en la región central, quedando restringida a dos dominios separados por la RIO (Fig. 1.3C). Esta dinámica, donde a partir de un dominio uniforme se obtienen dos dominios laterales (Fig.

1.3D-F), sugiere la existencia de un represor en la zona central y cuya expresión y/o actividad debe definirse durante la segunda mitad de L3.

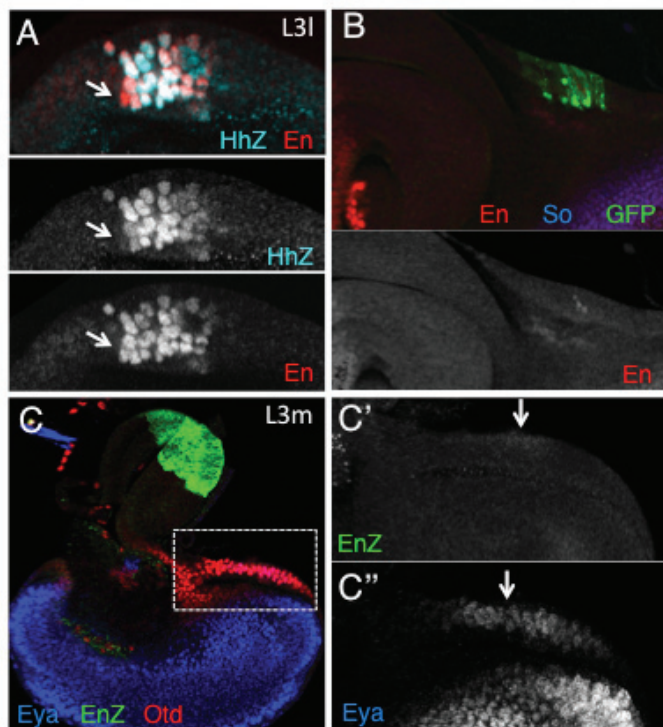


Figura 1.2. *en* es un gen diana de baja afinidad de la vía de Hh

Territorio ocular de discos L3 tardíos (A-B) o tempranos (C-C'). (A) Larvas *hhZ* teñidas con  $\beta$ -galactosidasa (azul, HhZ) y En (rojo). Se muestran los canales individuales. Las flechas señalan células que expresan En pero no  $\beta$ -galactosidasa. (B) Larvas *oc2>ptc $\Delta$ loop2-GFP* teñidas para En y So. La GFP marca la expresión de *ptc $\Delta$ loop2* (flechas). En esta región la expresión de En (rojo) es prácticamente nula. En este genotipo la expresión de So (azul) también se pierde confirmando la efectividad de la sobreexpresión de *ptc $\Delta$ loop2*. (C) Larva *enZ* con tinción para Eya (azul), *en-Z* ( $\beta$ -galactosidasa, verde) y Otd (rojo). A mayor magnificación se muestran los canales separados de *EnZ* (C') y Eya (C'') en la región que marca el primordio de la cabeza dorsal (expresión de Otd; cuadrado). En este estadio, cuando Eya se expresa de manera uniforme no se detecta expresión de En (flechas en C' y C'').

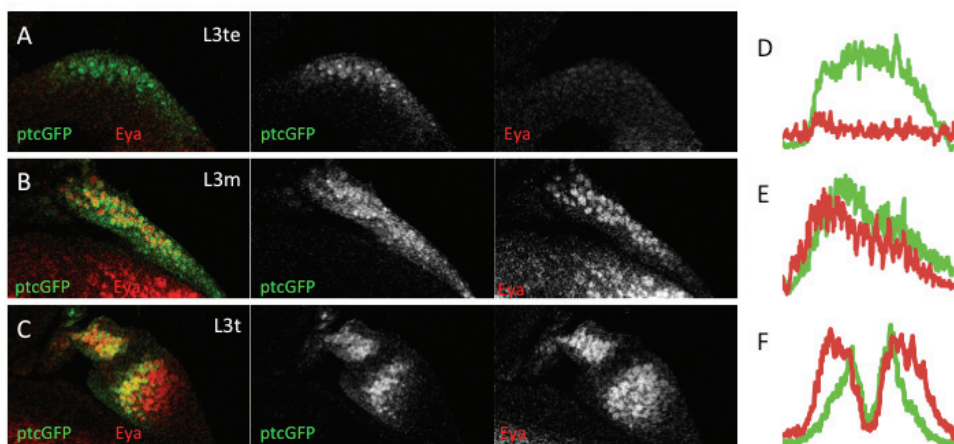


Figura 1.3.

Figura 1.3. Dinámica del gradiente de la vía de señalización de Hh y el GDR *eya*.

(A-C) Futura región ocelar de un disco temprano ('te', C), medio ('m', D) y tardío ('t', E) de larvas *GFP::ptc* teñidas con anti-*eya* (rojo). La GFP (verde) se detectó directamente. Se muestran los canales solapados y separados. (D-F) Los histogramas miden la intensidad de la señal de GFP (verde) y *Eya* (rojo) en los respectivos discos. *GFP::Ptc*, usado como detector de la señal de la vía de Hh, se expresa inicialmente a niveles altos y uniformes a lo largo de la región (D-E) para evolucionar a un patrón con dos dominios de expresión elevada separados por uno de baja expresión (F). La expresión de *Eya* se detecta primero a muy bajos niveles (D), luego incrementa sus niveles de manera uniforme en la región (E) y finalmente se expresa siguiendo un patrón similar a *Ptc* (F)

### 1.3.- *en* reprime la vía de señalización de Hh para especificar la región interocelar

*engrailed* (*en*) es un gen homeótico que codifica para un factor de transcripción (FT) que contiene un dominio de represión transcripcional, además del dominio 'homeótico' (*en inglés homeobox*) característico de este tipo de genes (Jaynes and O'Farrell, 1991). Trabajos previos han demostrado que *En* es capaz de reprimir transcripcionalmente dos componentes principales de la vía de Hh, *ptc* y *ci*, tanto en embriones como en el disco imaginal de ala (Eaton, 1990; Hidalgo and Ingham, 1990; Sanicola et al., 1995; Schwartz et al., 1995; Domínguez et al., 1996; Biehls et al., 2010). Con estos antecedentes nos planteamos si *en* podría estar actuando como represor de la vía en la RIO y permitir así la obtención del patrón final.

Para verificar esta hipótesis se llevaron a cabo tres experimentos. Primero, se comprobó el estado de la vía de señalización de Hh analizando la expresión de *ci* en discos tardíos (Forbes et al., 1993). Se analizó tanto la distribución de la proteína con un anticuerpo que reconocía la forma activadora (CiA; Fig. 1.4A), como su transcripción con una línea *ciZ* (Fig. 1.4B). En ambos experimentos la expresión de *En* y la expresión de *ci* eran complementarias. En segundo lugar, y para comprobar directamente el papel represor de *en*, se indujeron clones homocigóticos para la deficiencia *Df(2R)enE*. Se seleccionó esta deficiencia porque elimina tanto *en* como su parálogo *invected* (*inv*), lo que nos permitió evitar posibles efectos redundantes. El resultado observado en clones que se extendían a lo largo del territorio ocelar fue una expresión continua de *Ptc* y de *Ci* (Fig. 1. 4C). En los adultos mosaico los ocelos anterior y posterior aparecían fusionados (Fig. 1.4D). El área del ocelo fusionado era mayor que la suma del ocelo posterior y la mitad del anterior, sugiriendo que la ganancia de tejido ocular era a expensas de la cutícula. Por último, se





analizaron los efectos que la sobre-expresión de *en* causaba en el gen diana de Hh, *eya*. En clones marcados con GFP (*del inglés Green Fluorescent Protein*) que expresaban *en*, *eya* se reprimía de manera autónoma celular (Fig. 1.4E). Este efecto represor podía explicarse tanto por un efecto directo de *en* sobre *eya* o indirecto mediante el bloqueo de la vía de señalización de Hh. Para distinguir entre estas dos posibilidades, sobre-expresamos *ci* en la región ocelar haciendo la transcripción de *ci* insensible a la regulación de *en* y estudiamos sus efectos sobre *en* y *eya*. En estos discos la expresión de *en* y *eya* se extendía por todo el territorio, lo que sugería que Ci podía activar a *eya* en presencia de En (Fig. 1.5A-B). Los adultos crecidos en estas condiciones mostraban un complejo ocelar formado por un gran ocelo, sin cutícula interocelar (Fig. 1.5C), lo que indicaba que *eya* estaba actuando de manera epistática sobre *en*. En conclusión, los resultados arriba mostrados señalan a *en* como regulador negativo de la vía de Hh mediante la represión de, al menos, *ci* y *ptc*. Como consecuencia, la expresión de los GDRs y la especificación ocelar sólo puede ocurrir en regiones que flanquean el dominio de *en*, la futura RIO.

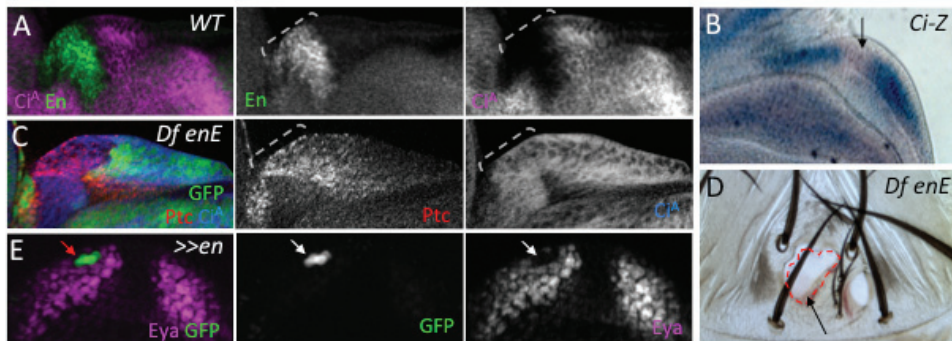


Figura 1.4. *en* es un represor de la vía de Hh y necesario para el desarrollo de la RIO.

(A-C, E) Región ocelar de discos L3 tardíos y (D) Región dorsal de la cabeza de un adulto. (A) Región ocelar de tipo salvaje teñida con CiA (magenta) y En (verde). Ambos genes se expresan en dominios exclusivos. (B) Larva *CiZ* con una tinción Xgal. El dominio de transcripción de *ci* muestra un hueco en la presunta región interocelar (flecha). (C) Clon *DfenE* que ocupa la región ocelar. Ahora aparece expresión de Ptc y Ci dentro del tejido mutante (marcado por la falta de GFP). La línea punteada en A y C marca aproximadamente la región interocelar en discos de condición salvaje. (D) Región ocelar de un adulto que contiene un clon no marcado *DfenE*. Un único ocelo se extiende por la mitad izquierda del complejo. (E) Pequeño clon de sobreexpresión de *en* (>>*en*; flechas), marcado con GFP (verde), que de manera autónoma celular reprime Eya (magenta).

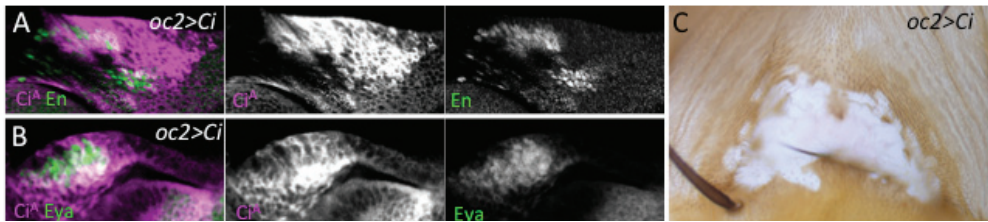


Figura 1.5. Los GDRs pueden expresarse en presencia de *en* y su función es epistática sobre este último

(A,B) Región ocelar de discos tardíos de tercer estadio que sobre-expresan *Ci* (marcado por *CiA*; magenta) y teñidos para *En* (A) y *Eya* (B). Ambos genes se expresan en un único dominio. (C) Cabeza de adultos *oc2>Ci* mostrando un gran ocelo, sin cutícula interocelar. El hecho de que en este genotipo se expresen tanto *En* como *Eya*, pero que el fenotipo sea "ocelo" indica que la función de los GDRs es epistática sobre *en*.

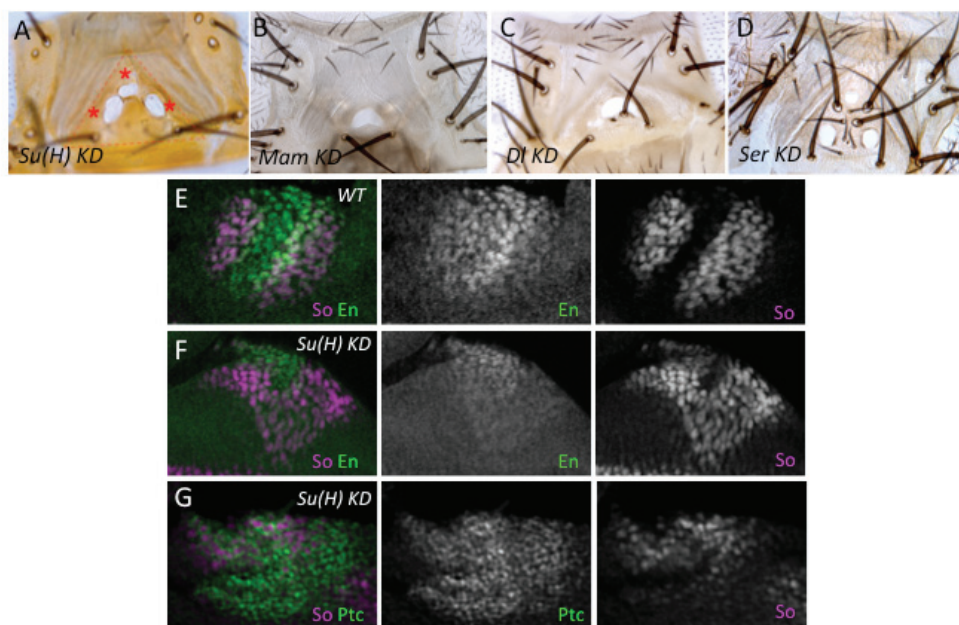
#### 1.4. - La vía de señalización Delta:Notch mantiene la expresión de *en* para especificar la región interocelar

Con el mecanismo anteriormente descrito la expresión de *en* derivaría en una situación de inestabilidad. *en* es activado por *Hh* y a su vez reprime a los componentes de la vía, *ptc* y *ci*. Este escenario nos incitó a pensar que, tras la inducción por *Hh*, en requería de un mecanismo adicional para estabilizar su expresión a altos niveles en la RIO y de manera independiente a *Hh*. Trabajos anteriores habían mostrado que en individuos homocigóticos para un alelo termo-sensible de Notch (*Nts*) los ocelos se fusionaban cuando se mantenían a la temperatura de restricción durante la etapas finales de la vida larvaria (Amin, 2004), generándose un adulto cíclope, similar al observado en los mosaicos *Df(2R)enE*. Con el objetivo de confirmar la implicación de la vía de Notch en el desarrollo del complejo ocelar procedimos a la manipulación genética de varios componentes de la ruta de Notch. Experimentos, dirigidos específicamente en la región ocelar, de pérdida de función del transductor nuclear *Su(H)* [(Fig. 1.6A; *Su(H)KD*; (Fortini and Artavanis-Tsakonas, 1994)] y el ligando Delta [*DIKD*; Fig. 1.6B; (Fehon et al., 1990)] o la sobre-expresión de una forma dominante negativa de mastermind (Fig. 1.6C; *mamDN*), un co-activador de Notch (Smoller et al., 1990; Xu et al., 1990), resultaron en la fusión de los ocelos. Curiosamente, experimentos de pérdida de función del otro ligando de la vía, *Serrate* [*Ser*; (Fleming et al., 1990)], no afectaron el tamaño de la RIO (Fig. 1.6D; *SerKD*). Las similitudes encontradas entre los fenotipos mutantes para la vía de Notch y la pérdida de *en* sugerían un requerimiento de la señal de Notch para mantener la expresión de *en*.

De hecho, discos *Su(H)KD* mostraban un dominio *en* de menor tamaño y con menor intensidad de expresión. En concordancia, la expresión de los dos dominios *eya/so* se extendía, entrando en contacto un dominio con otro (Fig. 1.6E-F).

En principio, la contribución de *DI/Notch* en la red de regulación podía ser sobre *Hh*, manteniendo su expresión o la actividad de su señal, o en paralelo. Sin embargo, cuando comprobamos el estado de la vía de *Hh* en discos con la vía de *Notch* bloqueada mediante el análisis de la expresión de *ptc*, se detectó un dominio (aunque no interrumpido, debido a la ausencia de *en*) de señal de *Ptc*, lo que era indicativo de la producción y actividad de la señal *Hh* en ausencia de *Notch* (Fig. 1.6G). Además, el hecho de que en las moscas mutantes para la vía de *Notch* ocurriese especificación ocler, destino celular controlado por *Hh*, favorecía la posibilidad de que *Notch* estuviera actuando en paralelo a *Hh*.

Figura 1.6.



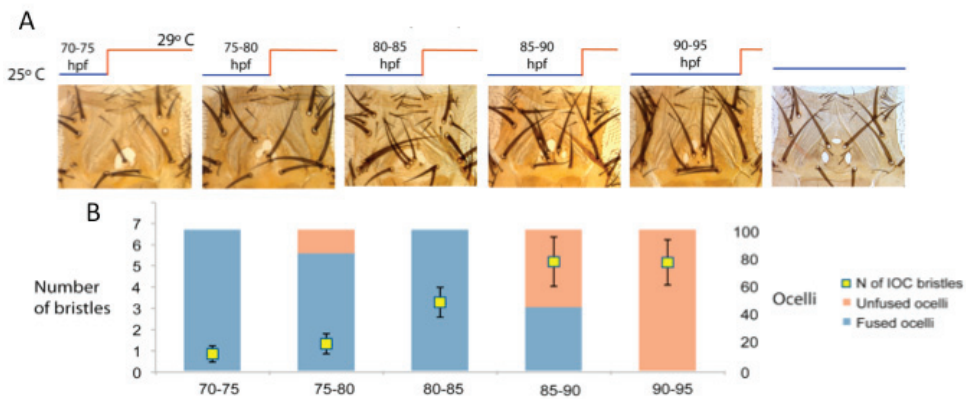
Con el fin de determinar la ventana temporal en la que el mantenimiento de *en* era dependiente de *Notch* y aprovechando la sensibilidad a la temperatura del sistema *GAL4/UAS* (ver Materiales y métodos) se llevó a cabo el siguiente experimento: en adultos que habían sobre-expresado un RNA de interferencia contra *DI* (RNAi; *DIKD*) a diferentes tiempos medimos las RIOs (Fig 1.7A), región dependiente de niveles de *en* elevados



**Figura 1.6. La expresión de *en* requiere de la vía de señalización de Notch para especificar la región interocelar**

(A-D) Cabezas adultas y (E-F) regiones ocelares de discos L3 tardíos. (A) Individuo *oc2>Su(H)RNAi* [*Su(H)KD*] mostrando ocelos más grandes a expensas de la RIO. No se observan quetas en la porción de cutícula que permanece. (B,C) Adultos *oc2>mamDN* (B; *MamKD*) y *oc2>DIRNAi* (C; *DIKD*) que muestran un ocelo fusionado en el centro del complejo. Apenas se observa cutícula de la RIO. El RNAi contra el otro ligando de Notch, Serrate (Ser) (D; *SerKD*) no causa estos efectos. Aunque parece tener algún efecto sobre la forma de los ocelos y el tamaño de las quetas de la RIO, la cutícula permanece invariable. (E) Expresión en condiciones salvajes de En (verde) y So (magenta). (F) En discos *Su(H)KD* el dominio de En (verde) es de menor tamaño e intensidad, mientras que So (magenta) se extiende y se fusiona en un único dominio. (G) En este genotipo, la señal de vía de hh no se ve comprometida dado que se detecta fuerte señal de Ptc (verde). Adaptado de (Brockmann et al., 2011).

y estables. La superficie interocelar se estimó por el número de microquetas formadas, siendo 0 ausencia de actividad de *en* y 6-8 la condición salvaje. Moscas con los niveles de la vía de Notch atenuados antes de las 80 horas post fertilización (hpf) mostraban ausencia total de cutícula ocelar. En el intervalo 80-85 hpf los adultos mostraban fenotipos intermedios, la cutícula interocelar aparecía incompleta y el número de quetas era variable (Fig. 1.7B). Esta ventana temporal coincidía con la aparición del dominio de expresión de *en* y la división de los dominios *eya/so* (ver Fig. 1.2 y 1.3). La inducción tras las 85 hpf no producía defectos significativos en el tamaño de la RIO, lo que establecía el periodo en el que la ex-



**Figura 1.7. Requerimiento temporal de la vía Delta:Notch para establecer la región interocelar**

(A) Puestas embrionarias de cinco horas de *oc2>DIRNAi* crecidas a 25°C y cambiadas a 29°C a los tiempos de desarrollo indicados. A 29°C la actividad del sistema GAL4/UAS se maximiza. Se muestra una vista representativa del complejo ocelar. Mantener el cultivo a 25°C resulta en moscas de tipo salvaje (panel final). Los animales que fueron cambiados a 29°C muestran macroquetas en lugar de las microquetas normales. Este hecho se debe probablemente a la diferenciación prematura en ausencia de señal de DI, independiente a su papel más temprano en la especificación de la RIO. (B) cuantificación del número de quetas interocelares (cuadrados amarillos con las barras de error estándar). Los rectángulos representan el porcentaje de moscas con ocelo fusionado (cíclopes; azul) y no fusionado (naranja). Tras las 85 hpf, el desarrollo de la región interocelar es independiente de DI/Notch.

presión de *en* era sensible a la acción de la vía de Notch en las 80-85 hpf.

### 1.5.- *hth* controla la extensión externa ocelar mediante la represión de *eya*

Hasta ahora hemos visto como destinos celulares distintos- ocelo y cutícula- son controlados por el morfógeno Hh y su vía de señalización. Pero, ¿cómo se fijan los límites en los que las células son susceptibles de recibir la señal de Hh y activar así la expresión de los GDRs? Ya hemos descrito como, en este contexto, *hth* controla el tamaño de los ocelos mediante, al menos, la regulación negativa de *eya* (ver Introducción) (Brockmann et al., 2011). Constatamos este hecho mediante clones de ganancia de función de *hth* (*>GFPhth*) y observamos que, efectivamente, se producía la pérdida de expresión de *eya* y que esta represión era autónoma celular (Fig. 1.8A). Curiosamente, este hecho se producía incluso cuando el clon se extendía a lo largo del dominio de expresión de *hh*, activador principal de *eya*. Durante el proceso de segmentación embrionaria, la actividad represora de *en* viene regulada por la acción del complejo formado por *hth* y *extradenticle* (*exd*) (Kobayashi et al., 2003), por lo que el resultado anterior podía explicarse tanto por una acción directa de *hth* sobre *eya* o bien indirecta, a través de *en*. Para resolver esa ambigüedad se analizó la expresión de *en*, así como el estado de la vía de Hh, en discos *hthKD*. Bajo estas condiciones *en* se expresaba a niveles normales en un dominio estable, donde, como en la situación salvaje, no se detectaba *ci* (Fig. 1.8B-C). De hecho, estos adultos presentaban región interocelar (Fig. 1.8D), sugiriendo que la acción represora de *en* sobre la vía de Hh no era dependiente de *hth*. En conjunto, los resultados mostrados apuntan a que la acción de *hth* está limitada a restringir la extensión externa de los dominios de expresión *eya/so*.

### 1.6.- La Red de Regulación Génica es robusta frente a fluctuaciones

Un aspecto importante de esta red de regulación era su dinámica espacio-temporal. Con el fin de probar si el razonamiento genético era capaz de generar el patrón ocelar, se desarrolló un modelo matemático incorporando todas las interacciones genéticas detalladas anteriormente (Fig. 1.9). El modelo reproducía con fidelidad el patrón cualitativo final de los genes diana partiendo de un dominio central de Hh introducido *de facto* (ver Apéndice 1 para detalles del modelo). Además, en términos generales la solución final mostraba estabilidad cuando se sometía a variaciones

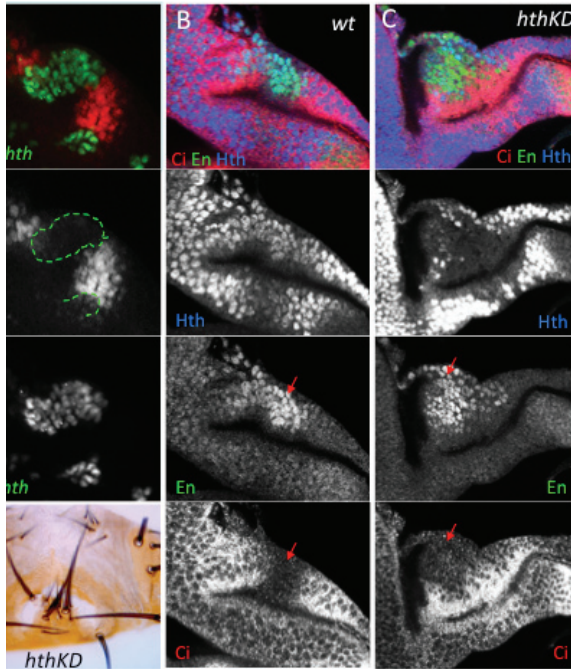


Figura 1.8. *hth* regula el tamaño ocular mediante la represión de *eya*.

(A) Clones, en la región ocular, que expresan *GFPth* (verde) teñidos para Eya (rojo). *GFPth* reprime la expresión de *eya* de manera autónoma celular. El clon está marcado por la línea de puntos en el canal de Eya. (B, C) Región ocular de discos control (A) y *oc2>hthRNAi* (*hthKD*; C), teñidos para Hth (Azul), En (verde) y Ci (rojo). En discos *hthKD* la señal de Hth desaparece del Complejo Ocular (CO) excepto por algunas células. En este genotipo, la expresión de *en* se detecta a niveles normales y la señal de Ci reprimida. La flecha roja indica el dominio de expresión de En. (D) Cabeza adulta de individuos *hthKD*. Los ocelos presentan forma irregular. La cutícula interocelar está presente.

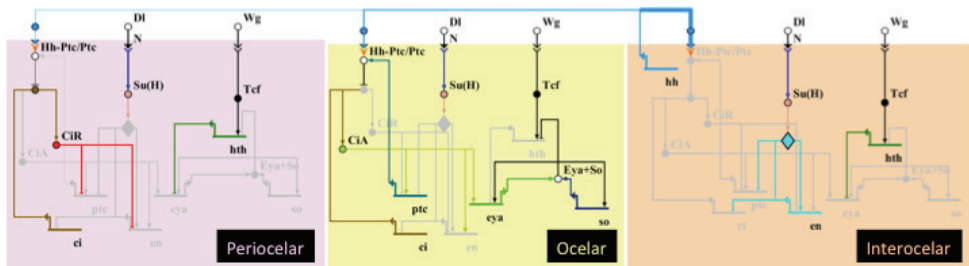


Figura 1.9. Lógica de la red de regulación génica del complejo ocular

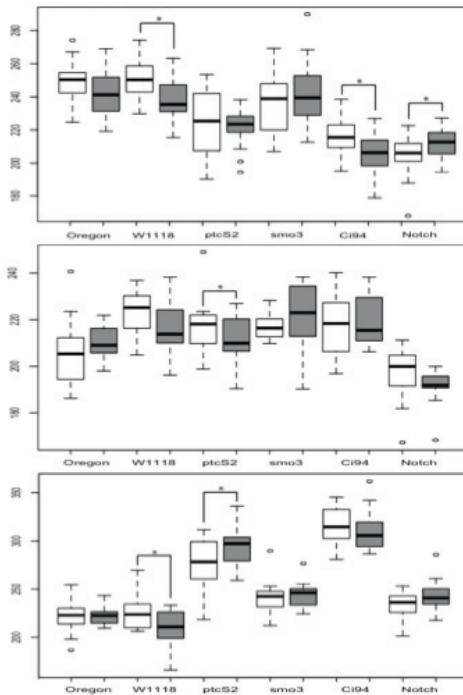
Arquitectura de la RRG del complejo ocular mediante representación en Biotapestry. Los genes están representados mediante líneas horizontales con flechas curvadas (sitio de inicio de la transcripción, SIT). Las interacciones positivas y negativas (líneas que emergen del SIT) están representadas por flechas y líneas respectivamente. Los círculos representan interacciones proteína-proteína. Los diferentes tipos celulares están simbolizados como cuadros de colores (nombrados consecuentemente). Las comillas angulares y los círculos representan la recepción y traducción de la señal respectivamente. Los círculos blancos fuera de las cajas representan los ligandos de la vía de señalización. Los genes y las interacciones se muestran en color si son activas, en gris si no lo son. De acuerdo a los niveles de Hh recibidos se especifican tres tipos celulares: interocelar, ocular y periocelar. La señal de Hh activa la expresión tanto de los GDR (*eya* y *so*) como de *en*. En las células interocelares, altas concentraciones de Hh promueven la expresión de *en*, quien, una vez activado, reprime la expresión de los GDRs mediante la inactivación transcripcional de *ptc* y *ci*, eliminando de esta forma la recepción de la señal. La expresión de *en* se mantiene mediante la actividad de la vía DI:Notch (esta interacción está representada mediante un rombo). En las células ocelares no hay expresión de *en* debido a los bajos niveles de la vía de Hh, que sí son suficientes para activar *eya* y *so*. La expresión de los GDRs también se define por la contribución de *hth*, quien probablemente es activado por la vía de Wg. En la región ocular Eya y So (actuando como un complejo) reprimen *hth*. Las células pericelares reciben niveles muy bajos de señal de Hh y la activación de los GDRs se previene por la acción negativa de Hth: esta represión contribuye a definir el tamaño de los ocelos. La región pericelular formará el frente en el adulto. Adaptado de (Aguilar-Hidalgo et al., 2013).



en las condiciones iniciales, y tan solo mostraba pequeñas desviaciones cuando se perturbaban los parámetros relativos a las tasas de producción y degradación. Para comprobar esta robustez en el sistema biológico, se sometieron varias cepas de *Drosophila* a fluctuaciones térmicas durante L3, lo que consideramos podía incrementar el ruido bioquímico (Li et al., 2009). Se midieron la longitud del eje mayor de los ocelos anterior y posterior y la RIO en diferentes adultos incluyendo dos cepas de referencia (la cepa salvaje *Oregon-R* y *w1118*) y cepas en las que la dosis de *smo*, *ptc*, *ci* o *Notch* estaba reducida a la mitad (ver Materiales y métodos). De los resultados podían extraerse dos conclusiones. Por un lado, el análisis indicó que el genotipo tenía una influencia significativa sobre el tamaño preciso y las proporciones del complejo ocelar, ya que distintas cepas mostraban diferencias de tamaño en los ocelos y en la RIO. Por otro lado, y directamente relacionado con el objetivo del experimento, encontramos que, para algunos genotipos, las fluctuaciones térmicas resultaban en desviaciones del tamaño respecto al control. Sin embargo, estas desviaciones eran más pequeñas que las encontradas entre genotipos (Fig. 1.10A). Por ejemplo, mientras que la diferencia en el tamaño ocelar entre *w1118* y *Notch*  $-/+$  (a 25°C) era del 12% aproximadamente, las fluctuaciones térmicas durante el desarrollo de los adultos *Notch*  $-/+$  afectaron el tamaño en un 5%. La medición de los coeficientes de variación del tamaño ocelar y de la RIO desveló que el ruido externo introducido en el sistema no resultaba en fenotipos especialmente ruidosos (Fig. 10B). Concluimos, por tanto, que como el modelo había predicho, el complejo ocelar “biológico” era robusto frente a variaciones (ver Apéndice 1).

### 1.7.- Especificación del ocelo *versus* especificación del ojo compuesto

Como ya hemos mencionado, cada uno de los ocelos está formado por bastantes menos células que el ojo compuesto. Uno de los mecanismos implicados en el crecimiento del ojo depende de que la vía de Notch active la expresión de *eyegone* (*eyg*) y éste, a su vez, dispare la expresión de la citokina Unpaired (Upd, codificada por el gen *outstretched*, *os*), un ligando de la vía JAK/STAT. Upd actúa como un factor de crecimiento de la población progenitora indiferenciada del primordio de ojo (Chao et al., 2004; Domínguez et al., 2004; Tsai and Sun, 2004; Reynolds-Kenneally and Mlodzik, 2005; Gutierrez-Aviño et al., 2009). Sin embargo, ni la expresión de *eyg* ni la vía JAK/STAT parecen estar activas en la región ocelar (Wang et al., 2010; Ekas et al., 2006). Trabajos anteriores han demostrado que el ocelo en desarrollo requiere de la vía de Wg (el homólogo en *Drosophila* de Wnt1) para la represión específica de *eyg* a través



Coefficient of Variation (Cv) expressed in percentage

	Posterior Ocellus		Anterior Ocellus		Intercellular Region	
Oregon/Oregon*	4,72	5,98	3,94	4,39	7,29	4,71
W1118/W1118*	4,84	6,39	6,59	6,84	7,42	8,69
ptcS2/ptcS2*	8,23	5,04	4,98	3,09	11,15	6,48
smo3/smo3*	7,24	7,52	7,05	6,06	7,32	5,05
C94/C94*	5,23	5,99	4,93	7,27	5,95	6,57
Notch/Notch*	5,97	4,15	4,99	4,99	3,49	6,40

\* with temperature cycles

Figura 1.10. El complejo ocelar es robusto frente al ruido.

(A) Gráfico de cajas que muestra las medidas del ocelo posterior, ocelo anterior y región interocelular de los genotipos indicados. La longitud está expresada en píxeles. Las cajas blancas representan cepas que han crecido a la temperatura constante de 25°C mientras que las cajas grises representan cepas sometidas a ciclos de temperatura (ver Materiales y métodos). Los círculos denotan valores atípicos del rango inter-cuartil. El tamaño de la muestra para el ocelo posterior, el anterior y la RIO es de 20, 10 y 20, respectivamente. Sólo se incluyeron hembras en el estudio. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las dos condiciones experimentales ( $p < 0.05$ ). (B) Tabla que contiene los coeficientes de variación dentro de los genotipos expresado en porcentaje.

de la activación de *orthodenticle* (*otd*), gen selector de la cápsula cefálica (Royet and Finkelstein, 1997; Wang et al., 2010). Para comprobar si la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina (vía canónica) podía estar implicada en la selección de la identidad de ocelo frente a la de ojo compuesto bloqueamos la vía de señalización en el territorio ocelar en tres puntos diferentes de la ruta: secuestrando  $\beta$ -catenina en la membrana; hiperactivando el complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina mediante la sobre-expresión de Axin; y bloqueando la respuesta transcripcional de la vía a través de la expresión de una forma dominante negativa de TCF. En los tres casos el resultado fue la transformación de la región en un pequeño ojo compuesto (Fig. 1.11), algo que nos resultó sorprendente teniendo en cuenta que mutantes *wg* estudiados hasta la fecha no mostraban este fenotipo (Ma and Moses, 1995; Treisman and Rubin, 1995; Royet and Finkelstein, 1996). No obstante, estos experimentos se llevaron a cabo con combinaciones hipomórficas (Treisman and Rubin, 1995) o con combinaciones termo-sensibles (Royet and Finkelstein, 1996). En este último caso, el periodo en el que se bloqueó la producción de Wg fue en la segunda mitad del tercer estadio larvario, más tarde que el momento de desarrollo que afectaban





nuestros experimentos. Entonces, ¿Cuál podía ser el mecanismo por el que la pérdida de actividad de la vía de Wg resultaba en la transformación ocelo-ojo compuesto? El laboratorio de Francesca Pignoni demostró cómo el la pérdida de expresión de *eya* producida por el bloqueo de la vía de Notch en el disco de ojo (*ey>SerDN*) se rescataba estimulando la proliferación. Este hecho les llevó a proponer que la baja expresión de Eya (asociada con una severa reducción en el tamaño del ojo compuesto en adultos) observada en mutantes de la vía de Notch estaba influenciada por el tamaño del territorio morfogenético más que por la vía de Notch *per se* (Kenyon et al., 2003). Así, una posible explicación de nuestro fenotipo podía estar asociada al tamaño del primordio, función que en el ocelo vendría regulada por Wg. Sin embargo, la estimulación de la proliferación en la región ocelar promoviendo la progresión del ciclo celular mediante la sobre-expresión de CyclinE (CycE) o del complejo CycD-Cdk4, ciclinas que regulan la transición de G1 a la fase S del ciclo celular (Knoblich et al., 1994; Datar et al., 2000), o mediante la sobre-expresión de STAT, componente de la vía de señalización JAK/STAT, asociada a fenómenos de proliferación en varios tejidos, incluyendo discos imaginales (Luo et al., 1999; Mukherjee et al., 2005; Ekas et al., 2006), no resultó

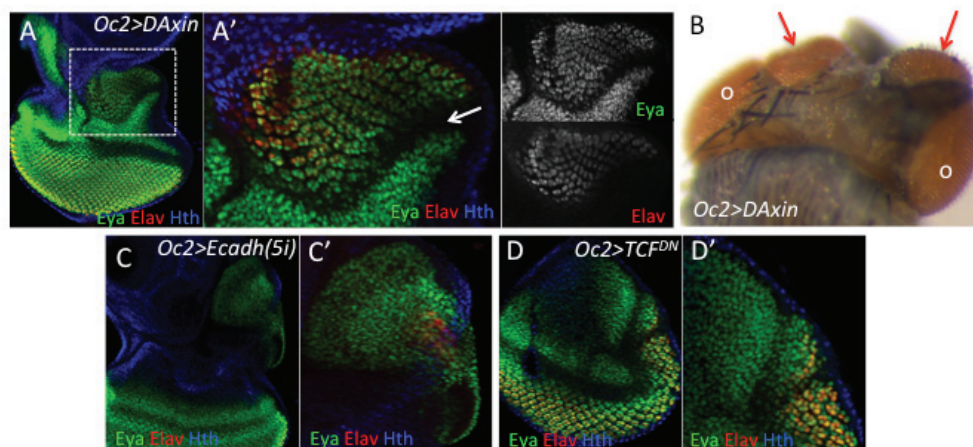
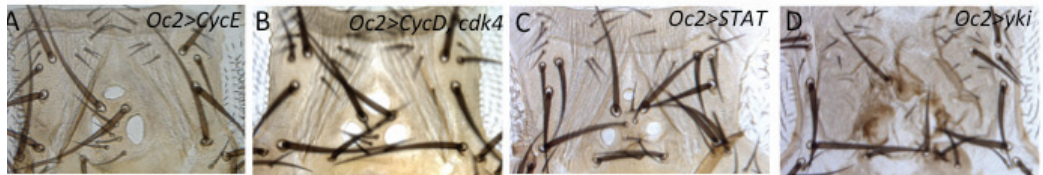


Figura 1.11. El bloqueo de la vía de señalización de Wg transforma el complejo ocelar en ojos compuestos.

(A-D') Discos L3 (A,C,D) y adulto (B) con la vía canónica de wg bloqueada. Este bloqueo se realizó en tres puntos de la vía: hiperactivando el complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina (*oc2>Daxin*; A-B), sequestrando  $\beta$ -catenina en la membrana (*oc2>Ecadh(5i)*; C,C') y bloqueando la respuesta transcrpcional (*oc2>TCFDN*; D,D'). En todos los genotipos se observan signos de transformación, siendo el ejemplo más claro la sobre-expresión de Daxin, donde en los discos se observa un nuevo surco morfogenético (flecha en A') y la tinción con Elav (marcador de diferenciación en las células fotorreceptoras) muestra una organización del tipo ojo compuesto. Los adultos de este genotipo (B) también revelan transformaciones completas a ojos compuestos (flechas), independientes de los ojos endógenos ("o")

en la transformación ocelo-ojo compuesto (Fig. 1.12A-C). El tamaño de los ocelos en esos genotipos era mayor que el de los ocelos controles, y en las tres situaciones aparecían con forma redondeada, en lugar de la habitual forma de elipse. Por el contrario, cuando sobre-expresábamos una forma activada de *yorkie* (*yki*), componente de la vía Hippo, involucrada en la regulación de la proliferación entre otras funciones (Huang et al., 2005; Staley and Irvine, 2010), las moscas resultantes presentaban sobre-crecimientos en la región. Sin embargo, en ningún caso aparecían ojos compuestos sino que aparecía una masa de tejido indiferenciado (Fig. 1.12D). Por lo tanto, ninguna de las tres manipulaciones (sobre-expresión de ciclinas, o sobre-activación de las vías JAK/STAT o Hippo), las cuales tienen en común el incremento de la proliferación celular, era suficiente para causar la transformación.



**Figura 1.12.** La mayor proliferación del primordio no es determinante para la transformación del ocelo a ojo compuesto

(A-D) Cabezas adultas de *Drosophila* resultantes de la estimulación de la proliferación durante el tercer estadio del desarrollo larvario. (A, B) La sobreexpresión de CycE (A) o CycD-cdk4 (B) aumenta el tamaño de los ocelos con respecto a la condición salvaje. Aumentar la proliferación mediante la hiperactivación de la vía JAK/STAT (*oc2>STAT*; C) varía la forma de los ocelos y en apariencia los hace más pequeños. La sobre-expresión de *yki* activado (co-factor transcripcional y transductor nuclear de la vía hippo) (D) produce sobrecrecimientos en la región de tejido indiferenciado, pero no su transformación a ojo.

Diferentes evidencias sitúan a Wg como regulador negativo del desarrollo del ojo en discos L3 antagonizando la vía de Decapentaplegic (Dpp) (Ma and Moses, 1995; Hazelett et al., 1998; Baonza and Freeman, 2002). Por tanto, de manera alternativa, nuestro resultado podía explicarse por una pérdida de la identidad regional de la cabeza y el consiguiente cambio a la ruta del dominio adyacente, es decir, a la ruta de especificación del ojo, mediante la des-represión de la vía Dpp. De hecho, cuando sobre-expresábamos, específicamente en la región ocelar, una forma activada del receptor de Dpp, *thickveins* (*tkv*), obteníamos tales transformaciones (Fig. 1.13A), siendo éstas en algunos casos prácticamente completas (Fig. 1.13B-B'). No obstante, tanto en el bloqueo de la vía Wg como en la sobre-activación de la vía Dpp, se observaban efectos no autónomos

severos que dificultó el análisis en profundidad del cambio de identidad que se estaba produciendo. Por ello, decidimos posponer la investigación de este interesante aspecto del control de la identidad de los órganos visuales y concentrarnos en otros aspectos, que se describen en los siguientes capítulos.

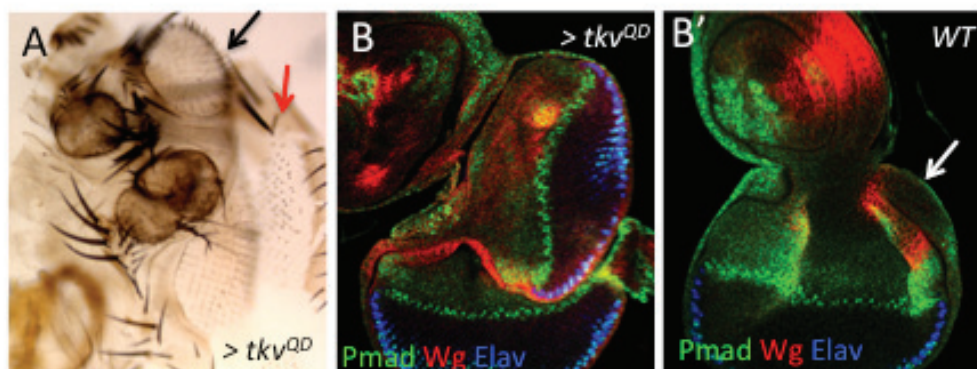


Figura 1.13. La activación de la vía de Dpp es suficiente para transformar el ocelo en ojo compuesto.

(A-B') Resultado de la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa del receptor de la vía de Dpp, *tkv* (*oc2>tkvQD*) en adultos (A) y discos imaginales de ojo-antena (B, B'). En la región dorsal aparece un pequeño ojo compuesto (flecha negra) además de los ojos endógenos (flecha roja). En los discos imaginales, esta transformación es evidente (B): el dominio de Wg (rojo) bordea la región de la cabeza dorsal, donde se observa un sobrecrecimiento, con fotoreceptores ordenados (Elav-positivos, azul) y un surco morfogenético, decorado con altos niveles de P-Mad (la forma activa del transductor nuclear de la vía de dpp, Mad). Este fenotipo (A, B) no es completamente penetrante y su expresividad es también variable. En discos normales (B') la ausencia de señal P-Mad denota la ausencia de activación de la vía de dpp en la región ocelar (flecha), al menos en discos normales (WT) de estadios tardíos.



# CAPITULO 2

## Identidad regional en la cabeza dorsal de *Drosophila*: el papel del gen selector *orthodenticle* y las vías de señalización de Hh y Wnt

Hasta ahora hemos visto cómo los genes determinantes de la retina (GDRs), *eya* y *so*, junto con *en* actúan como genes selectores de los ocelos y de la región interocelar (y sus quetas asociadas), respectivamente, y cómo sus diferentes dominios de expresión son activados por la vía de señalización de Hh durante el tercer estadio larvario (L3). Sin embargo, para que este proceso pueda ocurrir han debido producirse una serie de eventos previos que regionalicen el disco. Es decir, deben ‘seleccionarse’ los diferentes territorios competentes para que las distintas estructuras puedan emerger [ver Introducción; revisado en (Mann and Morata, 2000; Mann and Carroll, 2002)]. En el territorio del ojo del disco de ojo-antena (DOA), por ejemplo, la localización de las fuentes de Dpp y Wg durante fases tempranas de L2 en regiones opuestas [Dpp a lo largo del margen posterior y Wg en la región antero-dorsal; (Royet and Finkelstein, 1997; Cho et al., 2000)], define el borde entre el primordio del ojo compuesto y el primordio de la cabeza dorsal. Dpp coopera con *eyeless* (*ey*) en la iniciación y mantenimiento de la red de regulación que controla la determinación de la retina (Chen et al., 1999), mientras que Wg antagoniza la actividad de Dpp y promueve el destino de cápsula cefálica (Royet and Finkelstein, 1997; Baonza and Freeman, 2002) junto con la vía de señalización de Hh y los genes selectores *orthodenticle* (*otd*; (Royet and Finkelstein, 1995; 1996; Blanco et al., 2009) y *twin of eyeless* [*toy*; (Blanco et al., 2010; Brockmann et al., 2011)] (ver introducción).

Durante el desarrollo de la cabeza, Wg inicia la expresión de *otd* (Royet and Finkelstein, 1996; Blanco et al., 2009). En embriones tardíos todas las células del primordio del DOA, marcadas por la expre-



sión de *ey* (Quiring et al., 1994), expresan *otd* (Fig. 2.1A) y *wg* (Fig. 2.1B), sugiriendo que esta interacción *wg-otd* puede remontarse a, al menos, estadios embrionarios tardíos. Durante el desarrollo larvario, la expresión tanto de *otd* como de *wg* desaparece paulatinamente del disco y sólo se mantiene en la región antero-dorsal [Fig. 2.1C y C'; (Royet and Finkelstein, 1997)]. Una vez marcado el primordio de la cabeza mediante la expresión restringida de *otd* y *wg*, *otd* activa la transcripción de *hh* en esta región [Fig. 1C''; (Royet and Finkelstein, 1996)]. Así, el resultado, durante estadios L3 tempranos, es la co-expresión de *wg*, *otd* y *hh* en el dominio medial, es decir, en el futuro complejo ocelar (Fig. 2.1D).

Sin embargo, en estadios L3 tardíos los dominios de expresión de estos genes cambian, de manera que su expresión ya no solapa a lo largo de todo el territorio medial. La expresión de *wg* desaparece por completo del dominio medial y es confinada a dos parches flanqueándolo (Fig. 2.1E; (Royet and Finkelstein, 1996)]. Dado que la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en adultos *wgZ* aparece restringida a la cutícula orbital y el ptilinum (región anterior a la frente; Fig. 2.1F), se ha propuesto que estos parches de expresión en discos L3 corresponden a dichas estructuras (Royet and Finkelstein, 1996). Sin embargo, moscas mutantes para *wg* obtenidas mediante una combinación heteroalélica sensible a la temperatura (*wg<sup>IL114/wg<sup>CX3</sup></sup>*) que específicamente reduce la función de *wg* en los discos imaginales, y que han crecido a la temperatura de restricción durante las fases finales del tercer estadio larvario, no sólo pierden estos dominios sino que también pierden la región medio-lateral (frente), sugiriendo que *wg* podría actuar en estadios más tempranos o de manera no autónoma para especificar este subdominio [Fig. 2.1G; (Royet and Finkelstein, 1996)]. Ya hemos visto cómo la expresión de *hh* está restringida a la zona central del subdominio medial, es decir, la región que separa los dominios *eya/so* y que formará la RIO (ver Capítulo1; Fig. 2.1E'). La expresión de *otd*, por su parte, es detectada a lo largo de todo el primordio de la cabeza formando un gradiente, con los niveles más altos presentes en la región medial y decreciendo progresivamente en dirección lateral [Fig. 2.1E''; (Royet and Finkelstein, 1995)]. Se ha propuesto que estos altos niveles de expresión en la región medial son necesarios para reprimir transcripcionalmente *wg* y permitir así el desarrollo del CO (Royet and Finkelstein, 1996; Blanco et al., 2009) mientras que se requieren niveles más bajos de *otd* para la especificación del resto de la cápsula cefálica [Fig. 2.1H; (Wieschaus et al., 1992; Royet and Finkelstein, 1995)].

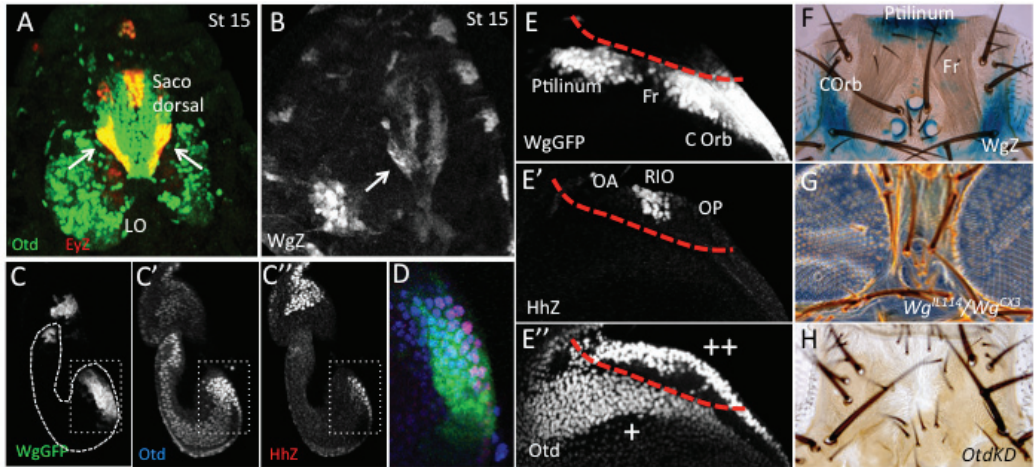


Figura 2.1. Dinámica del patrón de expresión de *wg*, *hh* y *otd* durante la especificación del complejo ocular.

(A, B) Vista dorsal de la región cefálica de un embrión tardío (estadio 15) *eyZ* (A) o *wgZ* (B). En este estadio *Otd* (verde en A) se expresa en el saco dorsal y en el lóbulo óptico (LO) y en todas las células del disco de ojo antenna (flecha en A), marcado en este estadio por la expresión de *ey* (monitorizado con una línea reportera *eyZ*; rojo en A). (B) La expresión de *wgZ* (detectado con un anticuerpo anti- $\beta$  Galactosidasa), en este estadio, en el DOA, sugiriendo que la interacción *wg-otd* puede derivar del embrión. (C-E) Futuro CO en discos L3 tempranos (C-D) y tardíos (E-E'') del genotipo *wgGal4>UAS-GFP;hhZ*. (C-C'') Imagen a baja magnificación a partir de la cual se ha obtenido la imagen D, mostrando la co-expresión de *Wg* (C), *Otd* (C') y *Hh* (C''). Los patrones de expresión de estos genes cambia durante el desarrollo de manera que los tres dominios ya no solapan (E-E''). (F) Tinción X-gal de una cabeza adulta *wgZ*, en las cuales la actividad de la  $\beta$  Galactosidasa se detecta en las regiones laterales. (G-H) Cabezas adultas resultantes de la pérdida de función de *wg* (G) y *Otd* (H).

En resumen, los trabajos de los laboratorios de Finkelstein y Gehring han ayudado a identificar muchos de los eventos regulatorios que ocurren en el proceso de estructuración de la cabeza dorsal durante el desarrollo del tercer estadio larvario. Así, en líneas generales, ambas RRGs resaltan el mismo principio: *Wg* es necesario para la especificación de la cabeza dorsal a través de la activación escalonada de *otd* y *hh*; éste último incrementa los niveles de *Otd* en la región medial. Aquí, altos niveles de *Otd* reprimen *wg*, permitiendo la especificación de los ocelos [Fig. 2.2A y B; (Royet and Finkelstein, 1996; Blanco et al., 2009)]. Sin embargo, estas interacciones genéticas no son suficientes para explicar cómo la expresión de *hh* varía y pasa de expresarse en todo el dominio medial, en estadios L3 tempranos (Fig. 2.2C), a quedar confinado a la región central dentro del dominio en las últimas fases L3 (Fig. 2.2D). En otras palabras, si imaginásemos un sistema formado por seis células (tres de ellas pertenecientes a la región medial y tres a la lateral), las redes deducidas de los trabajos de Finkelstein y Gehring, en las que la única interacción positiva sobre la transcripción de *hh* proviene de *Otd* (expresado



a altos niveles en las tres células mediales del sistema), no explicarían por qué, en las fases finales del tercer estadio larvario, la transcripción de *hh* queda confinada a la célula central (futura RIO) y desaparece de las células adyacentes (futuros ocelo anterior y posterior) (Fig. 2.2C' y D'). De hecho, esta transición es esencial para asegurar la correcta formación de los dominios *eya/so* y *en*, es decir, para asegurar el desarrollo del CO. Las dos redes, además, muestran algunas discrepancias entre sí. Por ello, en primer lugar nos planteamos resolver estas discrepancias y ver si su resolución era suficiente para explicar la especificación de las diferentes estructuras o si, además, era necesaria la adición de nuevos componentes y/o nuevas interacciones para satisfacer el patrón final (aOC-RIO-pOC).

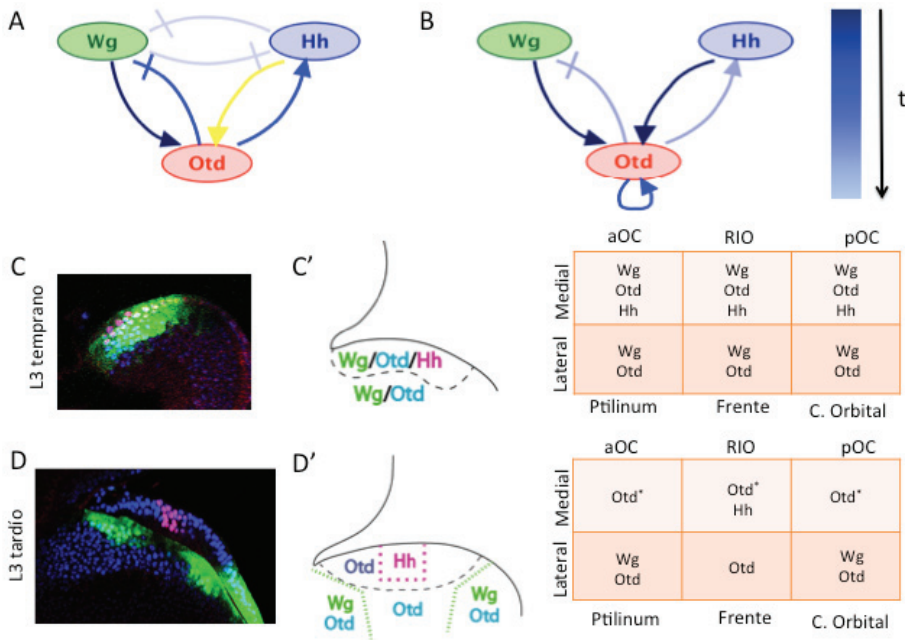


Figura 2.2. Modelo de regulación inferido de trabajos anteriores.

(A-B) Redes de regulación inferidas de los trabajos de Finkelstein (A) y Gehring (B). La degradación en el color azul de las flechas indica temporalidad. Los eventos regulatorios contradictorios en cuanto al tiempo aparecen en amarillo. (C-D') Discos *wgGal4>UAS-GFP*; *hhZ* tempranos (C) y tardíos (D) y la representación esquemática de los cambios de expresión (C' y D') en los diferentes dominios que forman la cabeza dorsal. La región medial formará el CO mientras que la región lateral contribuye al destino celular de los tejidos que rodean este CO.

## 2.1.- *wg* no reprime la transcripción de *hh* sino sus genes diana *eya* y *en*

Blanco y colaboradores propusieron que la segregación de los dominios de expresión de *wg* y *hh* era mediada por Otd y, por tanto, ocurría de manera indirecta. Sin embargo, y basándose en el hecho de que mutantes que eliminaban *wg* durante la segunda mitad del estadio L3 expandían el dominio de expresión de *hh* [y como consecuencia el complejo ocelar; Fig. 2.1G; (Royet and Finkelstein, 1996)], Royet y Finkelstein sugirieron que existía también una represión mutua entre estas dos vías de señalización. Para resolver esta discrepancia, realizamos el experimento opuesto, es decir, hiper-activamos la vía de Wg a lo largo del CO y analizamos sus efectos en la transcripción de *hh*, la actividad de la vía y los genes diana de la misma, *eya* y *en*. Para ello, dirigimos, específicamente en el CO, una forma constitutivamente activada de Armadillo (*Arm\**), homólogo de  $\beta$ -catenina en *Drosophila* y transductor nuclear de la vía canónica de Wg (Peifer and Wieschaus, 1990; Pai et al., 1997). Las moscas adultas de este genotipo (*oc2>Arm\**) carecían de estructuras del CO, las cuales habían sido reemplazadas por cutícula de la frente, destino celular controlado por Wg/Otd [Fig. 2.3A; (Royet and

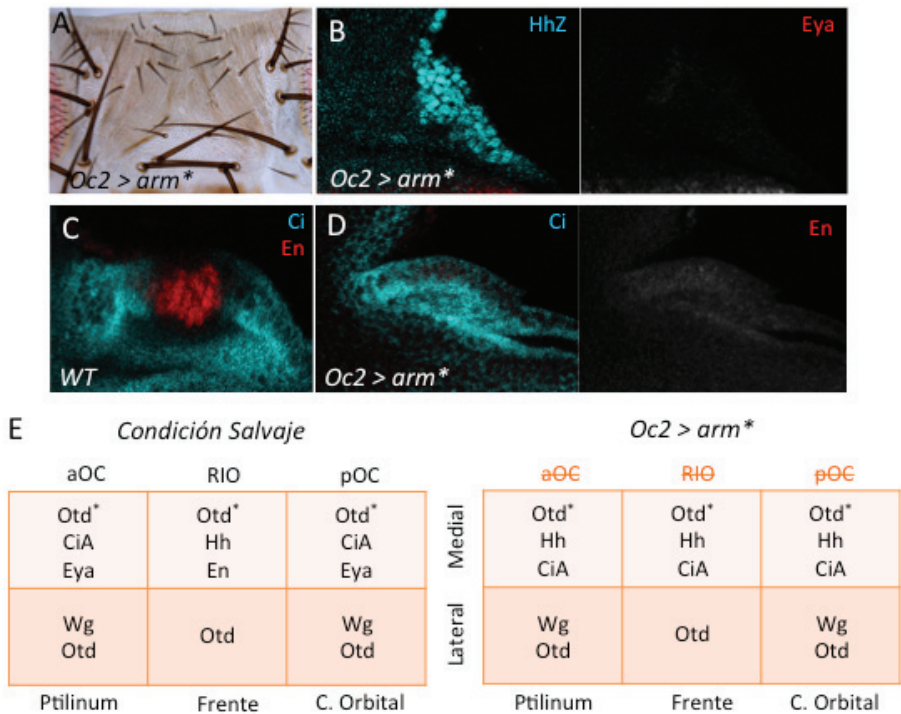






Figura 2.3. La vía de Wg reprime los genes diana de la vía de Hh *eya* y *en*.

(A) La expresión de una forma constitutiva del transductor de la vía de Wg Armadillo (*Arm*<sup>\*</sup>; *oc2>arm*<sup>\*</sup>) en cabezas adultas resulta en la pérdida del CO. (B-D) Región oclar en discos L3 tardíos teñidos con  $\beta$  Galactosidasa (azul en B) y Eya (rojo en B) o Ci y En (C y D). En discos *oc2>arm*<sup>\*</sup>; *hhZ* ni la expresión de *hh* (B comparar con Fig. 2.1E') ni los niveles de Ci (D comparar con C) se pierden, al contrario de lo que ocurre con la expresión de Eya (B) y En (D). (E) Representación esquemática de la expresión de genes relevantes en la condición salvaje (panel izquierdo) y en la *oc2>arm*<sup>\*</sup> (panel derecho). En esta última situación se pierde la expresión de Eya en los precursores del aOC y pOC, así como la expresión de *en* en la RIO, a pesar de que la expresión de Hh y Ci ahora se extiende por todo el dominio medial.

Finkelstein, 1996)]. En discos *oc2>Arm*<sup>\*</sup>, ni la transcripción de *hh*, monitorizada mediante un reportero *hhZ*, aparecía reprimida (Fig. 2.3B), ni la acumulación de CiA se reducía (Fig. 2.3C, D). Por el contrario, detectamos que el dominio de expresión de *hh* se expandía (comparar Fig. 2.2A y 2.3B). Sin embargo, en este mismo genotipo los dos principales genes diana de Hh (*eya* y *en*) se reprimían (Fig. 2.3B y D). Es decir, si retomásemos el ejemplo del sistema de seis células y lo comparásemos con la condición salvaje veríamos que, en discos L3 tardíos, tanto la transcripción de *hh* como su vía primaria aparecerían en las tres células mediales, pero no encontraríamos expresión de *eya* y *en* (Fig. 2.3E), indicando que la vía de Wg actúa reprimiendo directamente los genes diana de la vía de Hh.

## 2.2.- *hh* es necesario para la activación del *enhancer* auto-regulador de *otd*.

Una propiedad que no detectaron Royet y Finkelstein de la red y que sí fue descrita por Blanco y colaboradores era la capacidad auto-reguladora de *otd*. Estos autores caracterizaron el fragmento de DNA *oc7* (*enhancer ocelliless* mínimo) como el *enhancer* auto-regulador de *otd* (Blanco et al., 2009). Para comprobar en qué punto espacio-temporal entraba en juego la auto-regulación de *otd* en nuestra red, decidimos analizar la expresión del *enhancer* con respecto a la distribución de la propia proteína Otd, durante el tercer estadio larvario (Fig. 2.4). Para ello, usamos una línea reportera *oc7Z*. En estadio L3 temprano, cuando la expresión de Otd se distribuía de manera homogénea, no detectamos actividad del *enhancer* (Fig. 2.4A). Esta actividad se detectaba en fases posteriores, cuando los niveles de expresión de Otd comenzaban a incrementarse en la región medial (Fig. 2.4B). En las últimas fases larvarias, la actividad del *enhancer* era máxima y se extendía por todo el dominio medial, la región con mayores niveles de Otd (Fig. 2.4C).

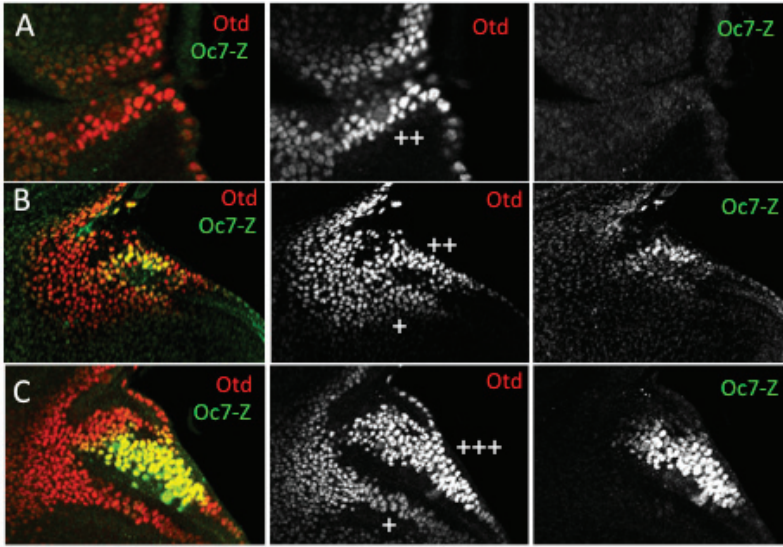


Figura 2.4. Dinámica de expresión del *enhancer* auto-regulador *oc7*.

(A-C) Discos de tercer estadio temprano (A), medio (B) y tardío (C) *oc7Z* teñidos para Otd (rojo) y  $\beta$  Galactosidasa (verde). Oc7 no está activo en disco temprano (A), su expresión comienza en estadios posteriores en la región más medial de la cabeza dorsal (B), para fijarse a altos niveles en las últimas fases del tercer estadio (C) en aquellas regiones con altos niveles de Otd (+++), cuya expresión también se incrementa con el tiempo de desarrollo. Los niveles medios y bajos de Otd aparecen marcados (++) y (+), respectivamente.

Saber que Hh era necesario para el mantenimiento de Otd (Royet and Finkelstein, 1996; Blanco et al., 2009) hizo cuestionarnos si los altos niveles que detectábamos de Otd en el CO eran el resultado de la activación de *oc7* por la vía de Hh. Para resolver esta cuestión utilizamos experimentos de pérdida y de ganancia de función de la vía de hh, en un fondo genético *oc7Z*. Así, el bloqueo de la vía Hh (*oc2>ptc $\Delta$ loop2*, o '*HhKD*'), específicamente en la región ocelar, producía la pérdida de la expresión de *oc7Z*, coincidiendo con la pérdida de los niveles altos de Otd (Fig. 2.5A). Para probar si Hh era suficiente para activar *oc7* usamos el *driver* *86c11Gal4*, el cual se expresaba en dominios más laterales de la cabeza (Fig. 2.5B). En discos *86c11>Hh* ('*HhOE*'), detectamos nuevos parches de expresión de *oc7Z*, los cuales aparecían asociados a nuevos dominios Eya positivos (Fig. 2.5C). De hecho, en adultos de este genotipo, las cabezas mostraban ocelos supernumerarios que se extendían hacia las regiones laterales y los cuales estaban asociados a una expansión de la expresión de *oc7Z* (Fig. 2.5C').

Como era de esperar siguiendo el razonamiento genético planteado anteriormente, en discos '*HhKD*', donde no había actividad de *oc7* y, por

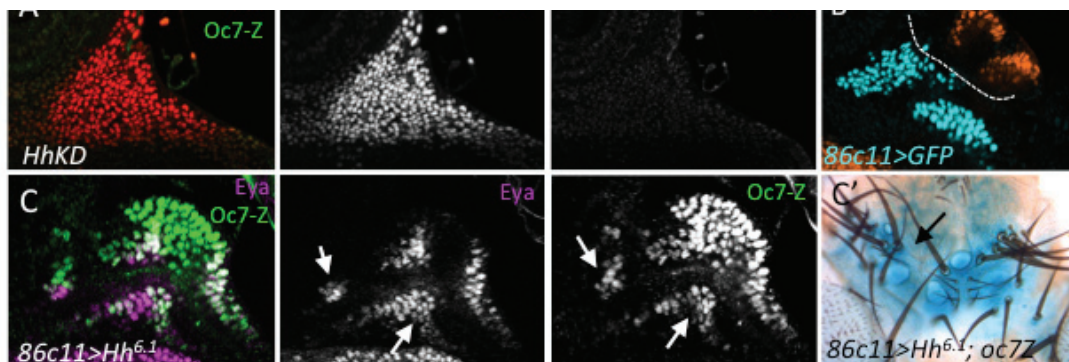


Figura 2.5. Hh regula la expresión del *enhancer* auto-regulador *oc7*.

(A) En discos con la vía de Hh bloqueada (*HhKD*) los niveles elevados de Otd (rojo) no se alcanzan y se pierde la expresión del *enhancer* auto-regulador, *oc7* (verde). (B-C) Región ocelar de discos L3 tardíos que muestran la sobre-expresión de GFP (cian en B) o de Hh6.1 (C) dirigida con el driver *86c11Gal4* en las regiones más laterales [comparar con patrón *Eya* (naranja) en B]. La expresión ectópica de Hh en estas regiones resulta en la activación ectópica de *Eya* (magenta) y *oc7* (verde) (C). Estos nuevos parches de expresión están asociados a ocelos supernumerarios en los adultos, los cuales mantienen la expresión del *enhancer* *oc7* (C').

tanto, Otd no alcanzaba sus máximos niveles, la transcripción de *wg* se desreprimía [Fig. 2.6A; (Royet and Finkelstein, 1996; Blanco et al., 2009)]. La distancia entre los ojos compuestos en este genotipo era ligeramente mayor que en la condición salvaje (Fig. 2.6A'), sugiriendo que el dominio continuo de expresión de *wg* que detectábamos no se debía a la pérdida del dominio medial sino a su transformación en tejido de identidad adyacente. Cuando, siguiendo un protocolo de tinción extracelular (ver Materiales y métodos), comparamos los perfiles del gradiente formado por Wg con respecto a su transcripción, en la cabeza dorsal (Fig. 2.6B), el disco de ala (Fig. 2.6C) y la antena (Fig. 2.6D), observamos que la distribución era diferente (Fig. 2.6B'-D'). Mientras que en el primordio de la cabeza el gradiente parecía no penetrar en la región medial, en el resto de tejidos analizados la distribución era simétrica con respecto a la fuente de Wg (Fig. 2.6B'-D'), sugiriendo la presencia de un mecanismo represor que, además de actuar a nivel transcripcional podría estar actuando a nivel proteico. Sin embargo, sería necesario un análisis más profundo para poder afirmar esta cuestión.

En conjunto, estos resultados nos llevaron a proponer un mecanismo por el cual Hh era responsable de incrementar los niveles de Otd mediante la activación del *enhancer* auto-regulador, *oc7*. A su vez, este incremento en los niveles de Otd sería el responsable de la represión de *wg* en la región medial y permitir así el desarrollo del CO (Royet and Finkelstein,



1996; Blanco et al., 2009), mediante la expresión de *eya* y *en* en sus respectivos dominios (Fig. 2.7A) (Aguilar-Hidalgo et al., 2013).

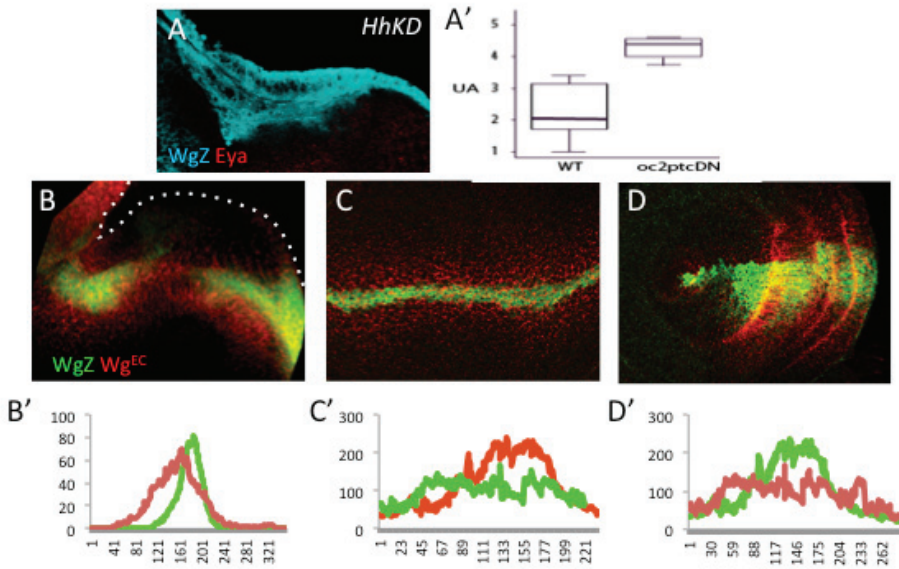


Figura 2.6.

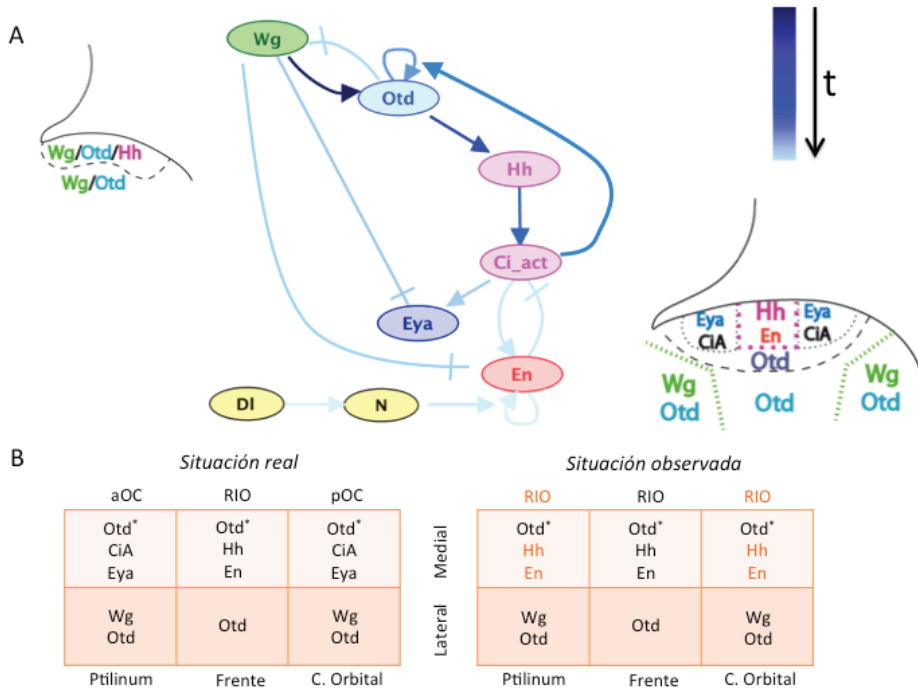


Figura 2.7.



Figura 2.6. Distribución extracelular de Wg en diferentes contextos.

(A) Discos L3 con la vía de Hh bloqueada (*HhKD*), en un fondo *wgZ*, mostrando la des-represión de la transcripción de *wg*. (A') Gráfico de cajas mostrando las medidas entre ojos compuestos en situación salvaje y *HhKD*. Longitud expresada en unidades arbitrarias (UA) ( $n=10$ ;  $p<0.05$ ). (B-D') Discos L3 tardíos *wgZ* mostrando la distribución extracelular de Wg (rojo; WgEC) en la región dorsal-anterior del DOA (B), en el futuro margen del ala (C) y en la antena (D) con respecto a la propia transcripción de *wg* (verde). Los discos van acompañados de sus perfiles de expresión (B'-D'). La proteína Wg extracelular (rojo) se distribuye de manera simétrica con respecto a la fuente de emisión (verde) en el disco de ala y antena (C' y D') pero no en el DOA.

Figura 2.7. Modelo de la red de regulación génica incluyendo las modificaciones descritas hasta el momento.

(A) La activación de la vía de Hh por la acción gradual de *wg* y *otd* es suficiente para elevar los niveles de Otd en la región medial, mediante la regulación del *enhancer* auto-regulador de Otd. Estos altos niveles de Otd conllevan a la eliminación de Wg de esta región. Esta represión es necesaria para permitir el desarrollo del CO. De lo contrario la vía de Wg actúa como regulador negativo de los genes diana de la vía de Hh *eya* y *en*. (B) Representación esquemática de la respuesta de la red si solo tuviésemos en cuenta las interacciones descritas en A. La expresión continua en todo el dominio medial, primero de *wg* y luego de *otd* debería asegurar la expresión de *hh* en todo el CO. Con el tiempo esta expresión derivaría en la activación de *en* que, tras fijar su expresión mediante la vía de Notch, reprimiría la vía de

### 2.3.- El dominio de expresión de *hh* se contrae durante el tercer estadio larvario.

Aún con las modificaciones que habíamos introducido, la RRG no podía explicar el cambio de expresión que sufría *hh* en el CO: el bucle de retroalimentación entre Otd y Hh debería asegurar el mantenimiento de la transcripción de *hh* en todo el dominio medial. Como consecuencia, la expresión de *en* se iniciaría en todo el territorio, evitando la expresión de *eya/so*, lo que conllevaría a un CO constituido únicamente por cutícula interocelar (Fig. 2.7B).

Sin embargo, una posible alternativa, que no había sido considerada previamente, era que las células que expresaban *hh*, que inicialmente se extendían por toda la región dorsal hasta el borde con el dominio de la antena, sufrieran una re-organización hasta formar un parche central de células que expresaban *hh*. Esto resultaría en la pérdida aparente de la expresión a ambos lados del dominio. Para comprobar si se estaba produciendo este fenómeno, seguimos el linaje de *hh* en la región dorsal del disco del ojo, y la comparamos con la expresión en discos de estadio L3 tardío usando un reportero *hh-GAL4* y el método G-TRACE [ver Materiales y Métodos; (Evans et al., 2009)]. En este experimento, el marcador RFP (*del inglés Red Fluorescent Protein*) describe la transcripción de *hh* actual, es decir, la expresión en estadios L3 tardíos, mientras que la

GFP se expresa de manera permanente en todas aquellas células que en algún momento durante el desarrollo han expresado *hh*. Bajo esta premisa, no esperaríamos grandes discrepancias entre la RFP (actual) y la GFP (linaje), si el patrón final de *hh* derivase de una re-organización celular. Sin embargo, si algunas células hubiesen perdido la expresión de *hh* durante el desarrollo, esas células expresarían GFP (linaje), pero no el marcador RFP. Esta última situación fue la observada en los discos, sugiriendo una pérdida de expresión de *hh* a ambos lados del dominio central a lo largo de L3 (Fig. 2.8A).

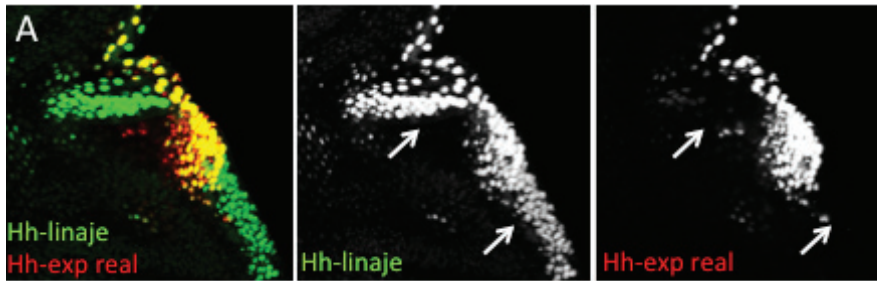


Figura 2.8. El dominio de expresión de *hh* se contrae durante el tercer estadio larvario.

(A) Disco L3 tardío, obtenido mediante el sistema G-TRACE (ver Materiales y Métodos) mostrando el patrón expresión de *hh*. La comparación de la expresión del linaje (verde) y la actual (roja) indica una pérdida de expresión de *hh* a ambos lados de la futura RIO (flechas).

## 2.4.- *en* mantiene la transcripción de *hh* en la región interocelar

Los resultados arriba mostrados indicaban una pérdida de expresión de *hh* durante las fases tardías del tercer estadio larvario. Es durante estas fases del desarrollo cuando la expresión de *en* se construye en un dominio prácticamente solapante con el observado para *hh* [(ver capítulo 1; (Royet and Finkelstein, 1997; Aguilar-Hidalgo et al., 2013)]. Trabajos anteriores habían demostrado que embriones mutantes para *en* perdían la expresión de *hh* en la región posterior de cada parasegmento, proponiendo a *hh* como gen diana de *en* durante el desarrollo embrionario (Lee et al., 1992; Mohler and Vani, 1992; Tabata et al., 1992). Una dependencia similar ha sido descrita en el compartimento posterior del disco de ala durante la vida larvaria (Tabata and Kornberg, 1994; Simmonds et al., 1995; Tabata et al., 1995). Con estos antecedentes nos preguntamos si *en* podría ser necesario para el mantenimiento tardío de *hh*. Para resolver esta cuestión, en primer lugar, analizamos la expresión de *hh*, en discos de estadio L3 tardíos, en condiciones salvajes y de pérdida de función de *en*. Para ello y mediante una lí-

nea *hh-Gal4* recombinada con *UAS-GFP*, definimos el patrón de expresión de *hh* (*hhGFP*) cuando sobre-expresábamos un RNAi contra *en* (*'EnKD'*) y cuando no (Fig. 2.9A-B). En discos *hh>enRNAi*, *GFP*, el dominio de expresión de *hh* aparecía con menor intensidad en la señal de GFP y extendido por todo la región medial, solapando con la expresión de *eya*, cuyos parches anterior y posterior aparecían fusionados debido a la falta de *en* (Fig. 2.9B). El fenotipo en cabezas adultas, las cuales perdían la RIO y presentaban un único ocelo, confirmaba la eficiencia del *knock-down* (Fig. 2.9C). Para comprobar que la pérdida de la señal de GFP en los discos *EnKD* no era debido a la presencia de dos UAS (*UAS-GFP+UASenRNAi*), hembras de la línea *Hh-Gal4*, *UAS-GFP* fueron cruzadas con machos que en su cromosoma X portaban un *UAS-LacZ* y se midió la intensidad de la señal de la GFP en machos (un UAS) y hembras (dos UAS) de la progenie (Fig. 2.9D). Aunque la señal en la hembras era ligeramente inferior, los resultados no mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ;  $n=15$ ), sugiriendo que la pérdida de señal observada en los discos de condición mutante era debido a la pérdida de *en*.

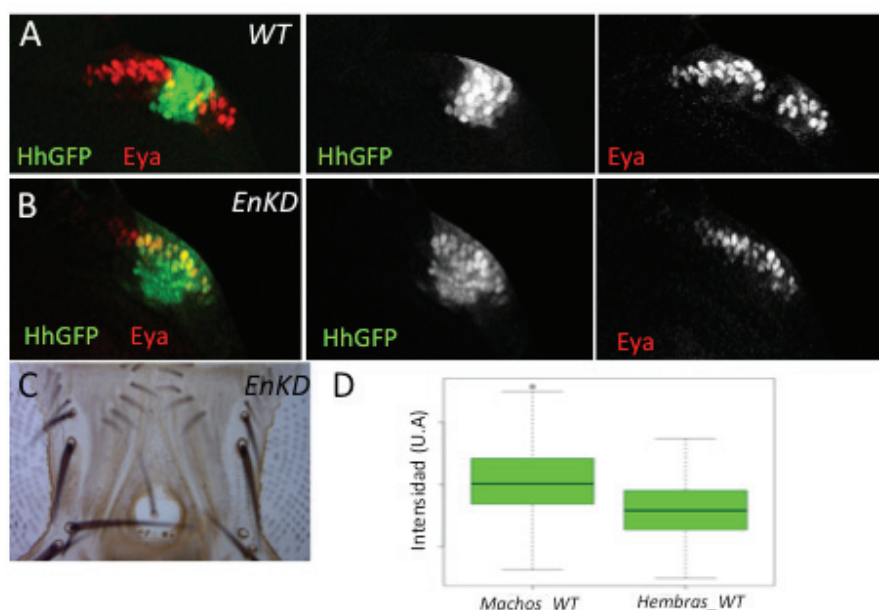


Figura 2.9. La pérdida de *en* atenúa la expresión de *hh* en la RIO.

(A-B) Discos L3 *Hh>GFP* (A) o *Hh>EnRNAi; GFP* (B) teñidos con Eya (rojo). La señal de GFP se reduce en condiciones *EnKD*. (C) Cabeza adulta del genotipo *Hh>EnRNAi*. En estas moscas, la RIO desaparece y sólo se forma un gran ocelo, indicativa de la eficiencia del KD. (D) Gráficos de cajas que muestra las medidas de intensidad de la señal de GFP en machos portadores de un UAS y en hembras con dos UAS ( $n=15$ ;  $p < 0,05$ ). Los puntos fuera de la caja indican medidas fuera de la media. Las diferencias entre gráficos no son significativas (test de Fischer y t-student).

En segundo lugar y para evaluar directamente la capacidad de *en* de activar la transcripción de *hh*, indujimos clones de ganancia de función de *en*, en un fondo *HhZ*. Cuando analizamos la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en clones marcados con GFP, observamos que, efectivamente, *en* podía activar la transcripción de *hh* de manera autónoma celular (Fig. 2.10A), sugiriendo que en discos L3 tardíos *en* juega un papel importante en el mantenimiento de la expresión de *hh* en la RIO.

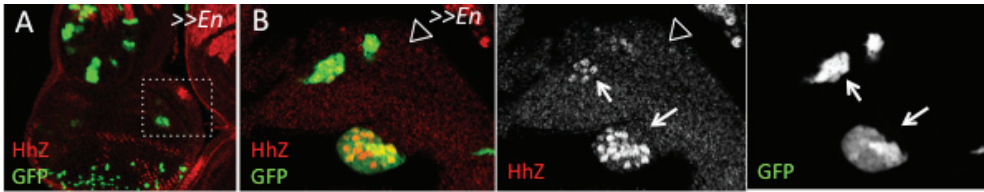


Figura 2.10. La expresión ectópica de *en* es suficiente para activar la transcripción de *hh*.

(A-B) Clones de expresión de *en*, usando la técnica del *flip-out* ( $>>En$ ), marcados con GFP, en un fondo *hhZ*. La región punteada en A (en un plano focal mostrando la expresión endógena de *hh*) se muestra a mayor magnificación en B y en un plano focal más medial. La expresión ectópica de *en* puede activar la transcripción de *hh* fuera del dominio medial de la cabeza dorsal (flechas en B).

La entrada de *en* como regulador positivo de la transcripción de *hh* (Fig. 2.11A) justificaba, a priori, el hecho de que éste último mantuviese su expresión en las células que expresaban *en*, permitiendo así la correcta especificación del ocelo anterior y posterior, libres de transcripción de *hh* y *en* (Fig. 2.11B). Sin embargo, siguiendo el razonamiento genético planteado en estos dos primeros capítulos de tesis y teniendo en cuenta que tanto la acumulación observada de CiA en los dominios adyacentes a la RIO, con niveles similares a otras regiones, como en las células anteriores al SM, donde la actividad de la vía es máxima (Fig. 2.11C), así como que la señal de GFP::*Ptc* en secciones transversales de la región dorsal apareciese dentro de los dominios *eya/so* en las células más próximas al dominio de *hh/en* (Fig. 2.11D), hizo preguntarnos por qué *en* no se activaba en estas células, pertenecientes a los dominios precursores de los ocelos. Esta activación en las células vecinas (con la consiguiente pérdida de *ptc* y *ci*) debería provocar la acumulación de estos dos factores en las células contiguas, en un proceso que derivaría en la activación final de *en* a lo largo de todo del dominio medial. Este hecho sugiere la adición de nuevos componentes a la RRG que actuarían limitando la región en la que *en* se puede activar. Estos componentes tendrían, presumiblemente, expresión asimétrica a lo largo de la región medial, definiendo de esta manera el patrón final aO-RIO-pO.

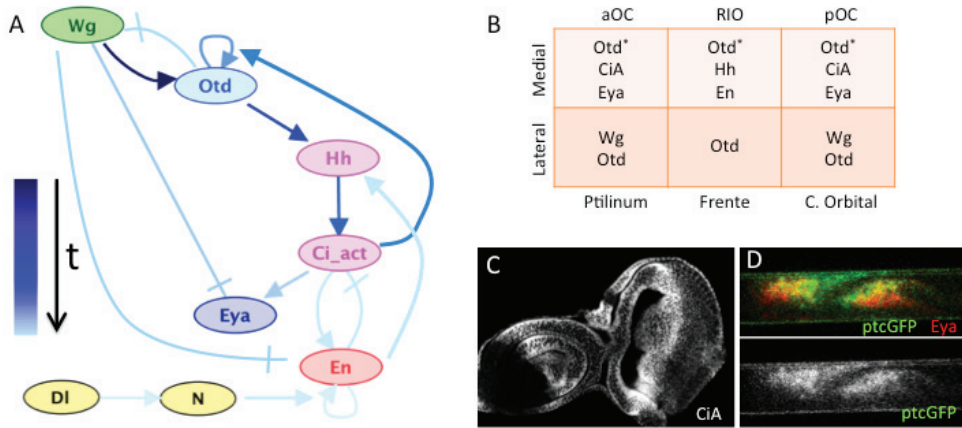


Figura 2.11. RRG que opera durante la especificación del CO

(A) Una vez se ha iniciado la expresión de *en* en la RIO, *en* mantiene la expresión de *hh* (comparar con la RRG de la Fig. 2.7). Esta nueva interacción debería ser suficiente para asegurar la expresión de *hh* en la RIO y evitar así su activación en todo el CO (B). (C) Disco L3 tardío teñido con un anticuerpo anti-CiA, el cual reconoce la forma activadora de Ci. (D) Sección transversal de un disco de tercer estadio mostrando la expresión de *Eya* (rojo) y *GFP::Ptc* (trampa de proteínas). La GFP se acumula en las regiones más próximas a la RIO.



# CAPITULO 3

## Refinamiento del patrón final aOC-RIO-pOC: el papel del gen *Six3/Optix* durante el desarrollo ocelar

*Optix* es un segundo gen de la familia Six/so en *Drosophila* (Toy et al., 1998; Seimiya and Gehring, 2000). Aunque *Optix* y *so* tienen un alto grado de similitud en relación a su secuencia de amino ácidos, este último pertenece a la subclase *Six1/2*, mientras que *Optix* ha sido identificado como miembro ortólogo de la subclase *Six3/6* de vertebrados (Cheyette et al., 1994b; Serikaku and O'Tousa, 1994; Pignoni et al., 1997; Toy et al., 1998; Seimiya and Gehring, 2000). La importancia funcional de los genes *Six3*, durante el desarrollo normal del ojo en particular y las estructuras anteriores en general, ha sido sugerida por diferentes trabajos. Así, mutaciones en el gen *SIX3* humano están asociadas a holoprosencefalia y microftalmia (Wallis et al., 1999). De manera similar, ratones mutantes homocigóticos para *Six3* carecen de ojos y presentan defectos craneofaciales severos (Lagutin et al., 2003). Por otra parte, expresión ectópica de *Six3* de ratón en embriones de ratón y en peces medaka promueve el desarrollo de lente ectópica (Loosli et al., 1999; Lagutin et al., 2001). En concordancia, en peces cebra (*Danio rerio*), *Six3* se expresa en el ojo en desarrollo (Loosli et al., 1998) y el gen de pollo *cSix3* se expresa en la vesícula óptica y el ectodermo y su expresión es, finalmente, restringida a la futura retina y la placoda de la lente (Bovolenta et al., 1998). Consistente con la función de *Six3/6* en vertebrados, diferentes evidencias sugieren que el homólogo en *Drosophila*, *Optix*, también juega un papel importante durante el desarrollo del ojo compuesto. Como otros genes determinantes de la retina (GDRs), *Optix* se expresa en las células indiferenciadas (que se encuentran anteriores al surco morfogenético [SM; (Seimiya and Gehring, 2000; Kenyon et al., 2005)] y su expresión forzada en la antena puede generar ojos ectópicos (Seimiya and Gehring, 2000). Estudios



recientes, además, han demostrado que la pérdida específica de función de *Optix* en los ojos compuestos resulta en la ausencia o reducción del tamaño de los mismos, presumiblemente debido a que *Optix* está implicado en la regulación de la vía de señalización de Decapentaplegic (Dpp) (una molécula de la familia BMP2/4) y de otros GDRs durante la progresión del SM (Li et al., 2013).

Sin embargo, menos se sabe acerca del papel de *Optix* fuera del contexto del ojo compuesto en formación. Los datos de expresión sugieren que está activo durante el desarrollo del complejo ocelar (CO) (Seimiya and Gehring, 2000; Kenyon et al., 2005), pero la falta de mutantes de pérdida de función viables hasta la vida adulta, ha dificultado su caracterización funcional. Por ello, en este capítulo de la tesis nos propusimos analizar el posible papel de *Optix* durante la formación de los ocelos y ver si estaba implicado en la RRG mínima, necesaria para el correcto desarrollo de las diferentes estructuras que forman el CO.

### 3.1.- *Six3/Optix* se expresa de manera asimétrica en el complejo ocelar y se requiere para el desarrollo del ocelo anterior

El primer paso para tratar de elucidar la posible función de *Optix* durante el desarrollo ocelar fue definir su patrón de expresión. Para ello, usamos un anticuerpo específico para *Optix* (Kenyon et al., 2005). Su expresión, en discos de tercer estadio larvario, solapaba casi por completo con la expresión de *Eya* en el ocelo anterior (Fig. 3.1A flecha). Además, detectamos bajos niveles de expresión de *Optix* a lo largo del margen dorsal de la antena (Fig. 3.1A triángulo). Cuando, específicamente en la región ocelar, se dirigió un RNA de interferencia contra *Optix* (*oc2>OptixRNAi*; *OptixKD*), las moscas resultantes presentaban un ocelo anterior de menor tamaño, mientras que el resto del complejo, incluyendo la región interocelar (RIO) y los ocelos posteriores, permanecían intactos (Fig. 3.1B; comparar con 3.1E). Durante el desarrollo larvario, la pérdida de *Optix* aparecía asociada a una reducción en el dominio de expresión de *eya* (Fig. 3.1C). Para mapear con más precisión la región de la cabeza dorsal de los adultos que derivaba del dominio de expresión de *Optix*, utilizamos una línea *enhancer-Gal4* asociada al locus de *Optix* y que durante la vida larvaria recapitulaba el patrón de expresión de *Optix* en esta región (Fig. 3.1D). Esta línea la obtuvimos de las líneas de “trampas de *enhancer*” NP (*NP2631-Gal4*; ver Materiales y métodos) (Hayashi et al., 2002). La



tinción X-gal realizada en adultos *NP2631>LacZ* reveló una banda de expresión en la cabeza dorsal que se extendía desde el margen anterior de la misma hasta el ocelo anterior (Fig. 3.1E). Sí, como hicimos en el capítulo anterior, trasasásemos estas observaciones a un sistema de seis células, añadiendo la expresión de *Optix* en la célula correspondiente (célula aOC), veríamos que en la situación *OptixKD* la propia ausencia de *Optix* conduciría a la pérdida de expresión de *eya* y, consecuentemente, a la pérdida de la identidad del tejido (Fig. 3.1F). Cuando, en experimentos de ganancia de función, sobre-expresábamos *Optix* en el dominio de Hh (*Hh>OptixS1*; '*OptixOE*'), las cabezas adultas mostraban el fenotipo opuesto. Es decir, mostraban pérdida o reducción en el tamaño de la cutícula de la RIO, incluyendo la pérdida de las micro-quetas y las quetas anteriores, características de esta región (asterisco y flecha en Fig. 3.1G, respectivamente), la cual era reemplazada por tejido ocelar (Fig. 3.1G). Estos resultados sugerían que *Optix* jugaba un papel importante durante la especificación del ocelo anterior.

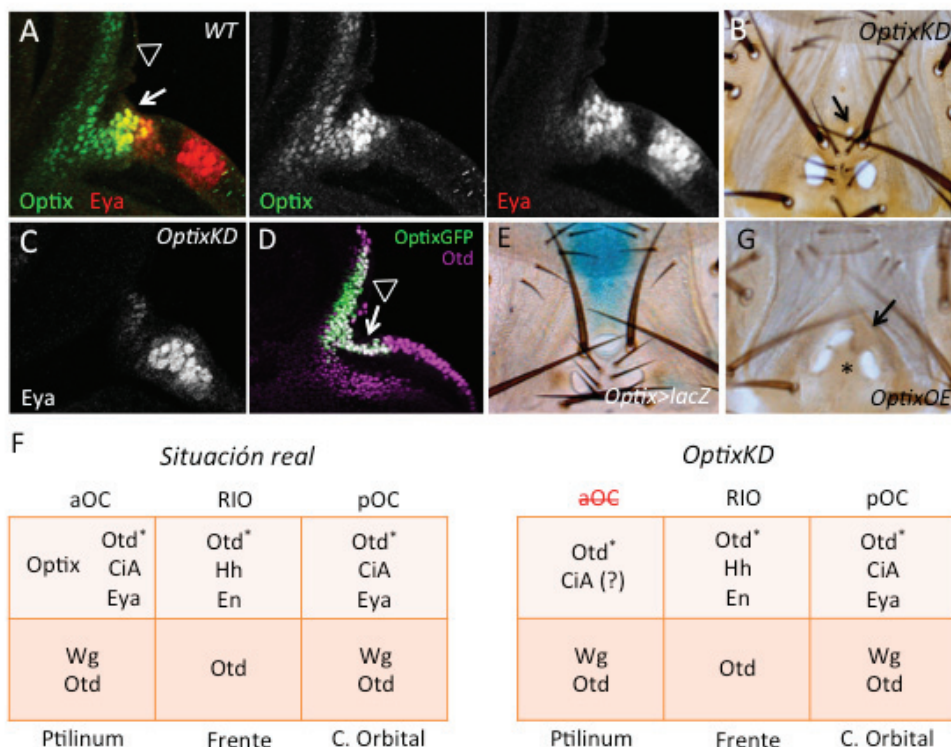


Figura 3.1.



Figura 3.1. *Six3/Optix* se expresa de manera asimétrica en el CO y es requerido para la foración del aOC

(A) Disco L3 tardío que muestra la expresión localizada de Optix (verde) en el dominio anterior, solapando con la población precursora del aOC, marcada por Eya (rojo) (flecha). Además se detectan niveles bajos de expresión de Optix en el margen de la antena (triángulo). (B-C) La pérdida de función de Optix (*oc2>OptixRNAi*; *OptixKD*) conlleva a la pérdida de específica del aOC en moscas adultas (B). Esta pérdida esta asociada a una reducción en los niveles de expresión de Eya (C). (D) Disco L3 tardío sobre-expresando GFP bajo el control de la línea *NP2631Gal4* y teñido con Otd (magenta), para marcar el primordio de la cabeza dorsal. La expresión de la GFP (verde) recapitula el patrón de expresión de Optix en el aOC (flecha) y margen de la antena (triángulo). (E) La actividad de la  $\beta$  galactosidasa en adultos *NP2631Gal4>lacZ* reveló expresión en la región anterior medial, extendiéndose hasta el límite con el aOC. (F) Representación esquemática de los dominios de expresión de los genes bajo estudio en la condición salvaje (panel izquierdo) y *OptixKD* (panel derecho). (G) La sobre-expresión de Optix en la RIO (*HhGal4>OptixS1*; *OptixOE*) resulta en cabezas adultas con una RIO de menor tamaño y sin quetas (asterisco).

### 3.2.- *Optix* no reprime la expresión de *wg* en el ocelo anterior durante el desarrollo larvario

Como hemos mencionado antes, mutaciones en el gen *Six3* derivan en defectos de desarrollo de las estructuras más anteriores, incluyendo los ojos (Wallis et al., 1999; Lagutin et al., 2003). Lagutin y colaboradores demostraron que, en ratones, estos defectos estaban asociados a una des-represión de *Wnt1* en el dominio de expresión de *Six3* (Lagutin et al., 2003). Un mecanismo similar ha sido descrito, recientemente, en *Tribolium*, donde la expresión de *Tc-wg*, restringida al protocerebro en condiciones salvajes, se expande hacia los dominios anteriores cuando se pierde la expresión de *Tc-six3* (Posnien et al., 2011). Por ello, y considerando que la hiper-activación de la vía de Wg, en el CO, reprimía la expresión de *eya* (Fig. 2.3B) era plausible imaginar que la reducción en el dominio de expresión de *eya* observada en la región anterior en condiciones *OptixKD* (Fig. 3.1C) podía ocurrir de manera indirecta, mediante la des-represión, en este dominio, de la vía Wg. Sin embargo, cuando, en discos *OptixKD* de estadio L3 tardíos, analizamos la transcripción de *wg*, usando una línea reportera *wgZ*, no observamos des-represión en el dominio anterior cuando lo comparábamos con la condición de tipo salvaje (Fig. 3.2A y 3.2B), indicando que, durante las fases tardías del tercer estadio larvario, *Optix* no reprime la transcripción de *wg* en el ocelo anterior. El hecho, además, de que no encontrásemos signos aparente de transformación o invasión del frente en los discos *OptixKD* (Fig. 3.1B; comparar con Fig. 1.2A y 2.3A, donde la des-represión o hiper-activación de *wg*, respectivamente, provoca la transformación del CO en cutícula de la frente), favorecía la hipótesis de no interacción en estas fases del desarrollo.

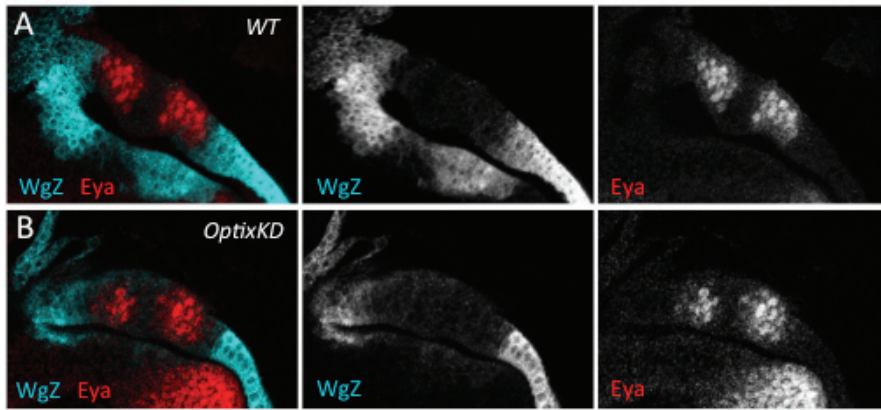


Figura 3.2. *Six3/Optix* no reprime la transcripción de *wg* en el aOC

(A,B) Discos L3 tardíos de condición salvaje (A) y *OptixKD* (B) teñidos para Eya (rojo) y  $\beta$  galactosidasa (*wgZ*; cian). La pérdida de expresión de Optix en el aOC no conduce a la des-represión de *wg* en esta región.

### 3.3.- El gen *Six3/Optix* actúa como represor de *en* en el ocelo anterior

Hasta la fecha, las evidencias experimentales tanto en vertebrados como en invertebrados apuntan hacia la falta de capacidad de Six3/Optix de interaccionar con miembros de la familia Eya, habilidad que sí poseen el resto de miembros de la familia (Pignoni et al., 1997; Heanue et al., 1999; Ohto et al., 1999; Seimiya and Gehring, 2000; Li et al., 2003). Sin embargo, sí se han caracterizado las interacciones entre las diferentes subclases de proteínas Six y miembros de la familia Groucho (Grc) en vertebrados. Estas interacciones, que formarían un complejo represor, se han demostrado, al menos, para miembros de la subclase Six3/6 y TLE1, subclase de la familia (Zhu et al., 2002; López-Ríos et al., 2003). En *Drosophila*, Optix interacciona con Groucho (Gro) y con Optix binding protein (Obp; CG30443) en ensayos de doble híbrido (Kenyon et al., 2005). Se ha propuesto que la interacción con Gro media la formación de un complejo represor cuando se expresa de manera ectópica que inhibe el programa de diferenciación correspondiente para inducir la formación de ojo ectópico (Anderson et al., 2012). Ante estos indicios era posible proponer la hipótesis de Optix actuando como represor de un regulador negativo del destino celular ocelar en la región anterior del CO. Dado que los patrones de expresión de *en* y *Optix* eran prácticamente complementarios (Fig. 3.3A) y que el resultado de los adultos *OptixOE* fenocopiaba las cabezas obtenidas en los experimentos de pérdida de función de *en* [comparar



Fig. 3.1G con Fig. 1.4D (*Df(2R)EnE*) y con Fig. 2.9E (*Hh>EnRNAi*)], en podía ser el regulador negativo reprimido por Optix.

Para comprobar esta posibilidad indujimos la pérdida de función de *Optix*, tanto en todo el CO (*oc2>OptixRNAi*; '*OptixKD*') como específicamente en el dominio de expresión de *Optix* (*NP2631>OptixRNAi*; '*OptixKD<sup>2</sup>*'), en un fondo *enZ* (Fig 3.3B y C). En ambas situaciones detectábamos bajos niveles de expresión de *eya*, indicativos, posiblemente, de cierta actividad de Optix residual en estos dos genotipos *OptixKD*. Sin embargo, la pérdida de función era suficiente para apreciar cambios en el patrón de expresión de *en*, monitorizado usando *enZ*. En los discos *oc2>OptixRNAi*; *en-Z* se observaba una extensión de la expresión de *enZ* hacia el dominio anterior en las células más laterales del complejo (Fig. 3.3B), lo que se correspondía con la expansión de la señal de X-Gal en las cabezas adultas (comparar Fig. 3.3A' y 3.3B'). En los discos del genotipo *NP2631>OptixRNAi*, sin embargo, la extensión del dominio la observábamos en las células más mediales (Fig. 3.3C). En concordancia, el ocelo anterior en las cabezas adultas no aparecía fusionado y la expresión de *en* se extendía por la nueva cutícula que los separaba (Fig. 3.3C'). Por el contrario, cuando sobre-expresábamos Optix, específicamente en la RIO (*Hh>OptixS1*; *OptixOE*), en un fondo *enZ*, la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa revelaba una atenuación en su dominio de expresión (Fig. 3.3D flecha). En consecuencia, la expresión de *eya* aparecía en un dominio continuo (Fig. 3.3D). Estos resultados sugieren que la expresión de *Optix*, localizada en el dominio anterior de *eya*, es clave para la distinción de los destinos celulares que diferenciarán en ocelo anterior (Optix positivo) y RIO (Optix negativo), respectivamente (Fig. 3.3E).

### 3.4.- La expresión de *Optix* está limitada al ocelo anterior por la acción negativa de *en* en la RIO

Durante el desarrollo embrionario de insectos los genes Hox, excepto *labial* (*lab*) que es el único gen Hox funcional en la cabeza y *proboscipedia* (*pb*) que no tiene función conocida durante la embriogénesis, comparten la función de reprimir los genes implicados en el desarrollo de la cabeza en el tronco como demuestran los embriones mutantes para dichos genes en *Drosophila* y en el escarabajo *Tribolium*, en los que estructuras del tipo cefálicas aparecen en cada segmento del tronco (REF). En particular, Coiffier y colaboradores demostraron que el conjunto de genes Hox denominados

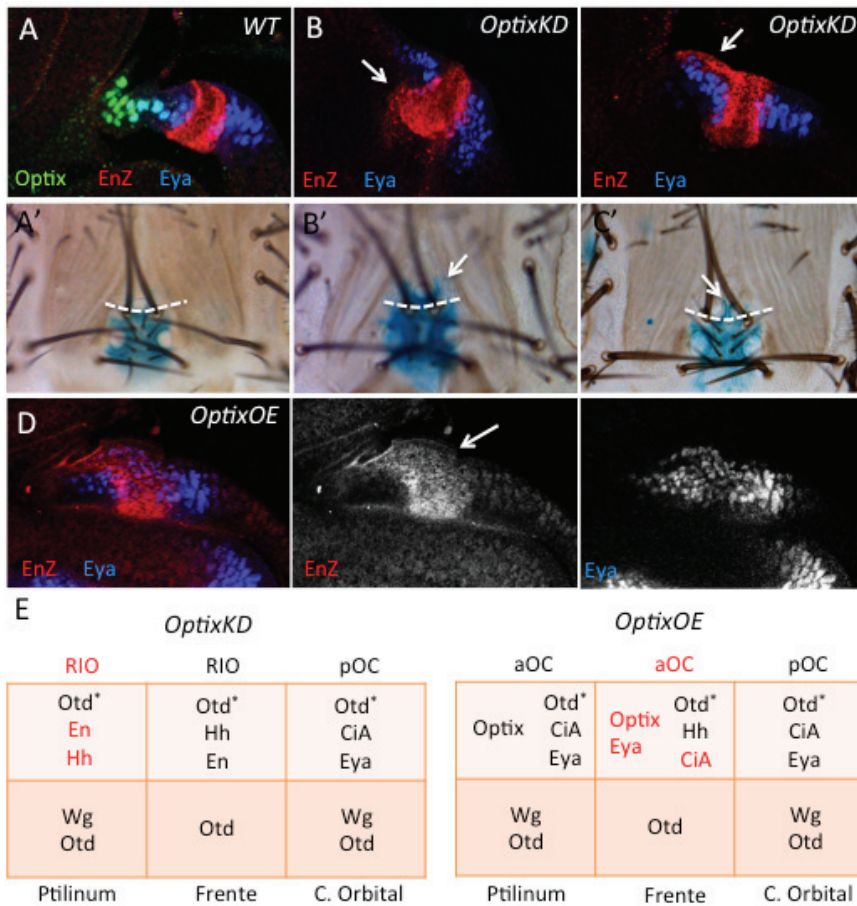


Figura 3.3. *Six3/Optix* regula la expresión de *en*

(A-C') Discos tardíos (A-C) o adultos (A'-C') de condición salvaje (WT) (A y A'), *oc2>OptixRNAi* (*OptixKD1*) (B y B') y *NP2631>OptixRNAi* (*OptixKD2*) (C y C') en un fondo *enZ*. En discos, la atenuación de *Optix* en todo el CO, usando *oc2* (B), causa una expansión del dominio *enZ* (flecha, comparar con A) y una reducción en el tamaño del dominio *Eya* anterior (azul). En Adultos (B'), la señal *enZ* se extiende hacia la región anterior rodeando el vestigio de aOC. En los discos *OptixKD2* (C), la señal de la  $\beta$  galactosidasa se extiende hacia la región más medial (flecha). En los adultos de este genotipo, el fenotipo más común es la no fusión de los ocelos y la consecuente extensión del dominio *enZ* (C' flecha). La línea punteada (A'-C') marca el límite más anterior de la expresión de *enZ* en los controles. (D) Disco L3 tardío *Hh>OptixS1, enZ* (*OptixOE*) teñido con *Eya* (azul) y  $\beta$  galactosidasa (rojo). La flecha marca la atenuación de *en* en esta región, donde, además, se observa des-represión de *Eya*. (E) Representación esquemática de un sistema de seis células simulando la situación *OptixKD* (panel izquierdo) y *OptixOE* (panel derecho).

centrales y posteriores (HoxCP; Sex combs reduced (Scr), Antennapedia (Ant), Ultrabithorax (Ubx), Abdominal-A (AbdA) y Abdominal-B (AbdB)) reprimían la expresión de *Six3/Optix* en la región anterior-ventral de cada segmento del tronco y abdomen (Coiffier et al., 2008). Sin embargo, cuando además de la acción de los genes HoxCP también reducían la actividad



de *en* y de *wg*, la des-represión de *Optix* se extendía hacia las regiones posteriores de cada segmento (Coiffier et al., 2008). Por ello, nos preguntamos si *En* en la RIO y *Wg* en las regiones más laterales podían estar restringiendo la expresión de *Optix* al dominio anterior del CO.

Con este objetivo sobre-expresamos *en* en el dominio anterior, para lo que utilizamos la línea *NP2631Gal4 (NP2631>en; 'EnOE')* e hiper-activamos la vía de *Wg* en el CO (*oc2>arm\**) y analizamos la expresión de *Optix* en discos de estadio L3 tardío (Fig. 3.4). A diferencia de lo que ocurría en el desarrollo embrionario, donde tanto *en* como *wg* parecían participar en la represión de *Optix* fuera de la cabeza, en el complejo ocelar sólo la acción de *en* parecía tener un efecto. Así, la expresión ectópica de *en* en el ocelo anterior reprimía hasta niveles casi nulos la expresión de *Optix* (Fig. 3.4B). En estos discos la expresión de *CiA* estaba disminuida en esta región (Fig. 3.4B), como cabía esperar de la acción represora de *en* sobre la vía de *Hh*. Igualmente, la expresión de *eya*, que depende de la vía de *Hh* (Blanco et al., 2009; Aguilar-Hidalgo et al., 2013), estaba disminuida en la región del ocelo anterior (Fig. 3.4B). Por el contrario, apenas observamos efectos sobre estos marcadores cuando forzábamos el mantenimiento de la vía de *Wg* en el complejo ocelar (Fig. 3.4C). Las cabezas adultas cuando sobre-expresábamos *en* presentaban cutícula en todo el dominio anterior, sin ocelo (Fig. 3.4D), a pesar de que detectábamos expresión de *eya* durante el desarrollo larvario, sugiriendo problemas en la diferenciación, probablemente debido a la falta de actividad de la vía de *Hh* por la presencia de *en* (Aguilar-Hidalgo et al., 2013).

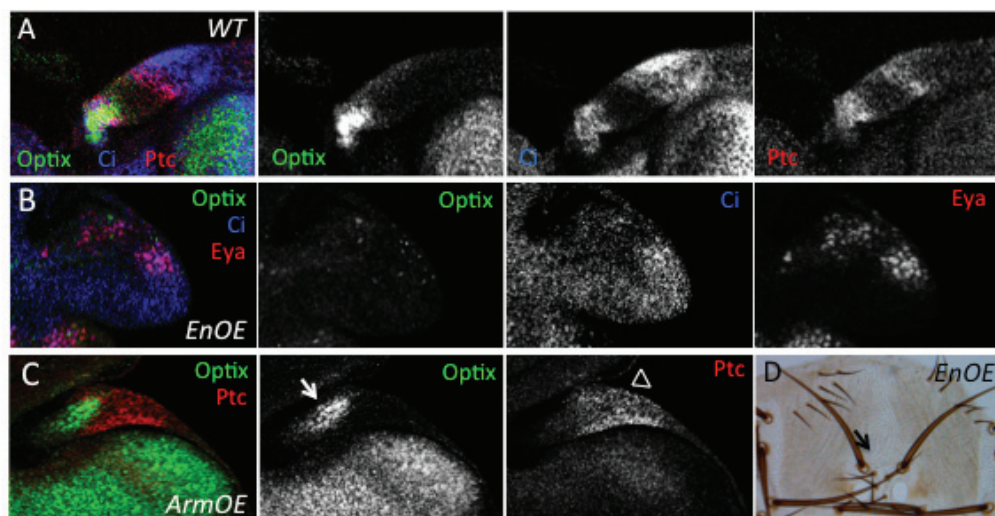


Figura 3.4.

Figura 3.4. *en* limita la expresión de *Six3/Optix* dentro del CO.

(A-C) Regiones oclares de larvas de tercer estadio de la condición salvaje (A), sobre-expresión de *en* (*NP2631>en; EnOE*) (B) o hiper-activación de la vía de Wg (*oc2>arm<sup>\*</sup>; ArmOE*) (C). La sobre-expresión de *en* reduce dramáticamente los niveles de Optix (verde) y *eya* (rojo). Por el contrario, la expresión de Optix no se ve afectada en los discos *ArmOE* (C, flecha). La expresión continua de *ptc* indica la pérdida de *en* y, por tanto, la eficacia del ensayo (C, triángulo). (D) Cabeza adulta *EnOE* mostrando la pérdida del aOC (flecha).

### 3.5.- Regulación de la expresión de *Optix* durante el desarrollo del CO

Hasta ahora hemos visto cómo *Optix*, cuya expresión solapa con la de *eya* en el ocelo anterior, es clave para el desarrollo del mismo mediante la regulación negativa de *en*. Cuando añadíamos, a nuestra RRG, este nuevo componente y su interacción correspondiente podíamos explicar la obtención del patrón final aOC-RIO (Fig. 3.5). Sin embargo, la entrada de Optix al sistema (y su interacción negativa) aparecía exclusivamente en el dominio anterior, por lo que, en este punto del trabajo, era inevitable preguntarse por qué *Optix*, cuya expresión era necesaria para delimitar la población precursora del ocelo anterior (*eya<sup>+</sup>/en<sup>-</sup>*) de la región precursora de la RIO (*eya<sup>-</sup>/en<sup>+</sup>*), no estaba activo en el ocelo posterior. Con la intención de aproximarnos a resolver cómo se establecía esta asimetría planteamos una serie de experimentos enfocados a descifrar la regulación de *Optix* en este contexto.

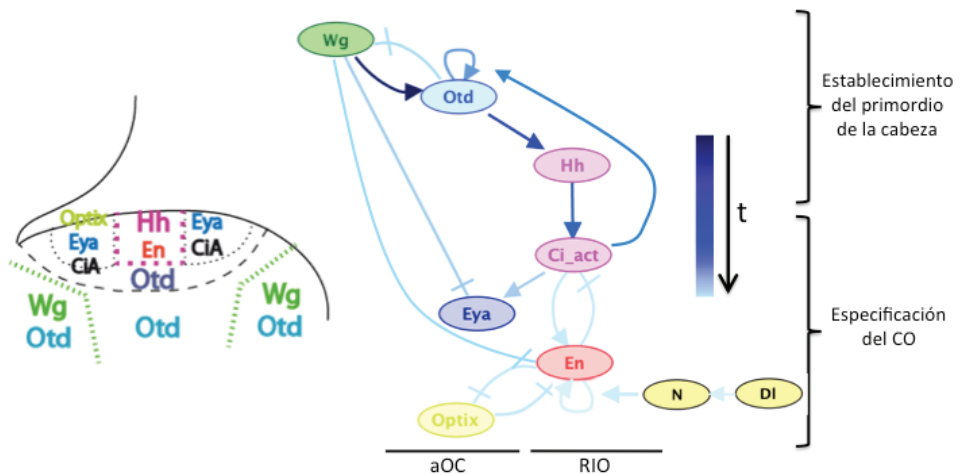


Figura 3.5. Modelo final de la RRG que establece el primordio y permite la especificación del CO

La adición de Optix, con expresión localizada en el aOC, como represor de *en* es suficiente para explicar el establecimiento de tres dominios (aOC-RIO-pOC) a partir de una expresión homogénea de *hh* en todo el CO.

En primer lugar, y basándonos en el hecho de que, hasta la fecha, la única información disponible situaba a *Six3/Optix* como gen diana de Pax6, comprobamos si la pérdida de *twin of eyeless (toy; oc2>toyRNAi; ToyKD)*, único gen Pax6 activo en los ocelos (Punzo et al., 2002; Brockmann et al., 2011), estaba implicado en la regulación de *Optix*. Además, comprobamos también el estado de *Optix* en discos donde la vía de hh o la expresión de *otd* había sido bloqueada (HhKD o OtdKD), ya que ambos factores estaban implicados en la activación de otros GDRs durante la especificación del CO (Royet and Finkelstein, 1996; Blanco et al., 2009; 2010; Aguilar-Hidalgo et al., 2013). En las tres situaciones detectábamos expresión de *Optix* (Fig. 3.6), sugiriendo que ni la vía de Hh ni los FTs Toy y Otd estaban involucrados en la activación de *Optix*. En ocasiones, en los discos *OtdKD*, la expresión de *Optix* aparecía asociada a un parche de expresión de *eya* (Fig. 3.6C flecha). En adultos de este genotipo se desarrollaba un ocelo en las cabezas adultas en posiciones más posteriores (Fig. 3.6D), que nosotros atribuimos a ese parche de *eya*.

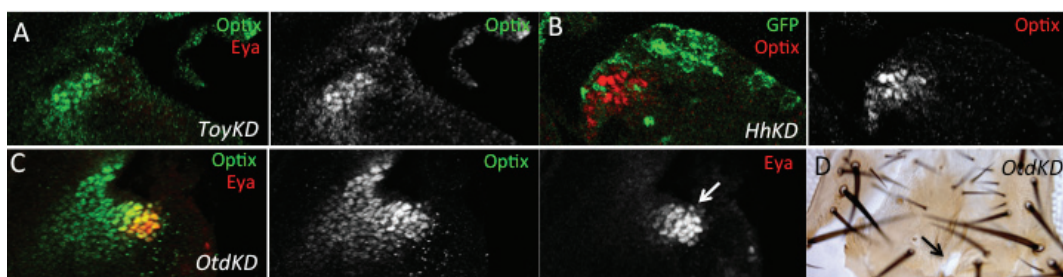


Figura 3.6. *toy, otd* y la vía de Hh no regulan la expresión de *Optix*

(A-C) Discos L3 *ToyKD* (A), *HhKD* (B) y *OtdKD* (C). En ninguna de las tres situaciones se observa pérdida de la expresión de *Optix* (verde en A y C; rojo en B). En A y C se usó *Eya* (rojo) para genotipar los discos. En discos *OtdKD* la expresión de *Optix* aparece asociada a un parche de expresión de *Eya*, que podría estar asociado con el ocelo desplazado que aparece en las cabezas adultas (D).

En segundo lugar, y a pesar de que los trabajos previos indicaban que *Optix* no estaba activo en los primordios de los órganos visuales durante el desarrollo embrionario [órganos de Bolwig (OB) y disco ojo-antena (DOA)] (Seimiya and Gehring, 2000; Coiffier et al., 2008), decidimos reanalizar la expresión de *Optix* en embriones tardíos. Para ello, comparamos la expresión *Optix* con la de *Otd*, cuya implicación durante el desarrollo del sistema visual de insectos y vertebrados ha sido ampliamente demostrada (Finkelstein et al., 1990; Simeone et al., 1993; Acampora et



al., 1998; Martinez-Morales et al., 2001; Ranade et al., 2008). Durante el proceso de involución de la cabeza [estadio 14 siguiendo la clasificación de (Campos-Ortega and Hartenstein, 1997)] detectamos expresión de *Optix* en la región anterior del cerebro, el clipeo-labro y los segmentos maxilar y labial (Fig. 3.7A Cb, CLb y asteriscos respectivamente). Por el contrario, no observamos expresión en la placoda del lóbulo óptico (que expresa *otd*) ni en el DOA, marcado en este estadio por la expresión de una línea reportera *eyZ* (Quiring et al., 1994). Una vez concluido el proceso de involución de la cabeza (estadio 15) cuando tanto los OBs como el DOA aparecen claramente marcados por la expresión de *otd* (Fig. 3.7B triángulo y flecha, respectivamente) la expresión de *Optix* se mantenía en la zona anterior del cerebro y el clipeo-labro así como en la línea medial del saco dorsal (SD; Fig. 3.7B). Por tanto, y tal y como estaba descrito, *Optix* no se expresa durante la especificación embrionaria en los primordios que conforman el sistema visual de *Drosophila* (Seimiya and Gehring, 2000; Coiffier et al., 2008).

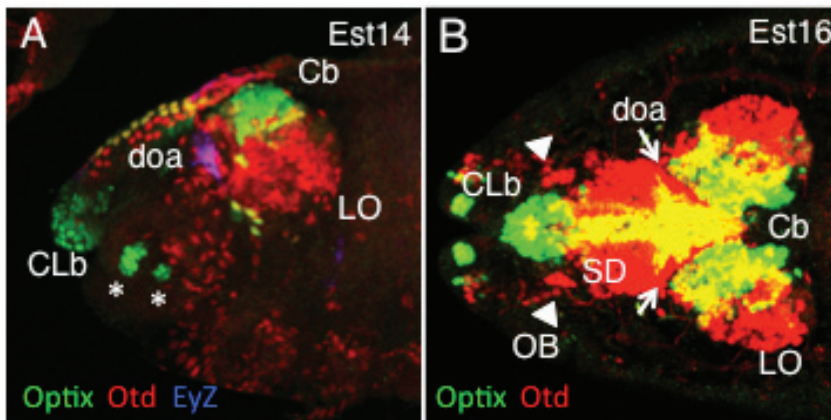


Figura 3.7. Expresión embrionaria de *Optix* y *otd*.

(A,B) Embriones de estadio 14 (A; vista lateral) y 16 (B; vista dorsal) teñidos con *Optix* (verde), *Otd* (rojo) y en A con  $\beta$  galactosidasa (*EyZ*). Antes de la involución de la cabeza (A) *Optix* se expresa en la región anterior del cerebro (Cb), clipeo-labro (CLb) y segmentos maxilar y labial (asteriscos), pero no se expresa en el primordio del disco de ojo-antena (doa), marcado por la expresión conjunta de *ey* (*eyZ*) y *Otd*. En estadios posteriores (B) *Optix* también se detecta en el saco dorsal (SD). La expresión de *Otd* en este estadio marca los órganos de Bolwig (OB, triángulo), sistema visual de la larva, además de expresarse en el doa, Cb, lóbulo óptico (LO) y SD.

Por último, decidimos analizar las regiones *cis*-reguladoras putativas asociadas a *otd*. Dado que la expresión de *Optix* solapa por completo con la de *otd* (si bien no todas las células que expresan *otd* expresan *Optix*) una posibilidad, no contemplada hasta el momento, era que la expresión continua de *otd* fuese, en realidad, el resultado de la acción combinada

de diferentes módulos reguladores. De esta manera, la expresión de *Optix* detectada en los discos *OtdKD*, podría deberse a la incorrecta elección del *driver* para dirigir el RNAi [*oc2Gal4*; *enhancer* auto-regulador; (Blanco et al., 2009)]. Para ello, seleccionamos una serie de líneas Gal4 producidas por el proyecto Janelia Farm (Jory et al., 2012) y depositadas en el centro de estirpes de *Drosophila* en Bloomington (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>) u otras generadas independientemente en el VDRC (<http://stockcenter.vdrc.at/control/main>) (Fig. 3.8A). Para el análisis utilizamos el método G-TRACE (Evans et al., 2009) para poder comparar el linaje (GFP) con la expresión en estadios L3. Sin embargo, para ninguna de las líneas empleadas detectamos expresión asimétrica en el CO (Fig. 3.8B), pero sí encontramos una que dirigía la expresión específicamente en los foto-receptores del ojo compuesto (línea 8864) y otra en la antena (línea 30F12). La expresión ubicua de GFP y ausencia de RFP detectada en varias de las líneas, sugería que esas regiones reguladoras estaban activas en el primordio del DOA durante el desarrollo embrionario pero no mantenían su expresión en las fases larvarias (Fig. 3.8B).

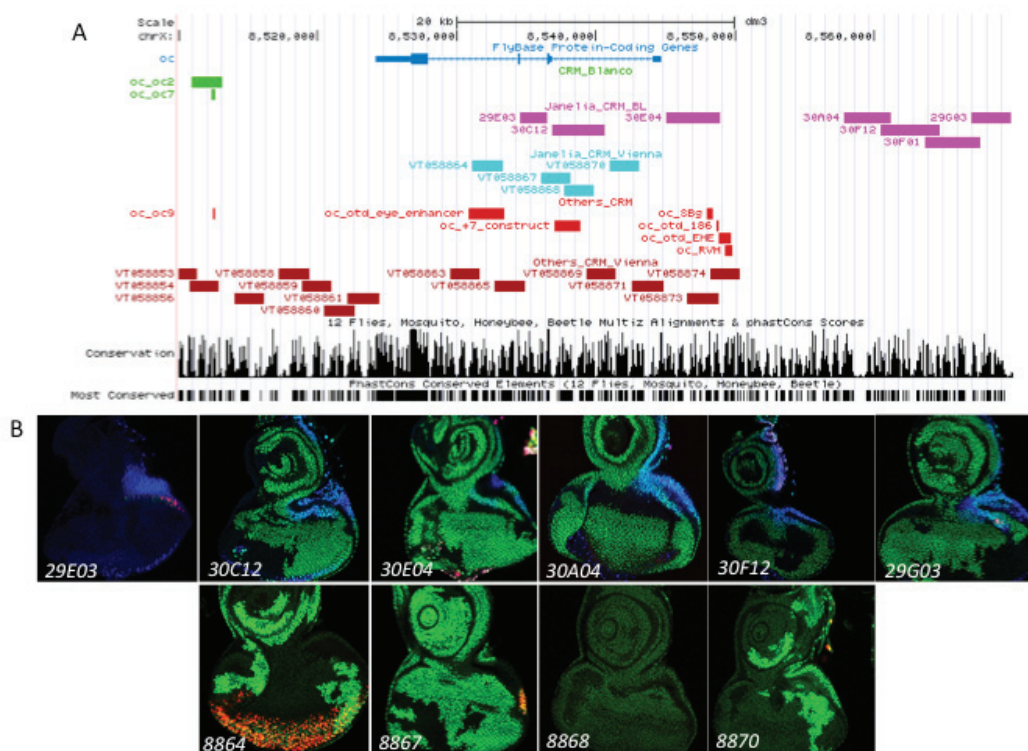


Figura 3.8.

Figura 3.8. Análisis de las regiones reguladoras descritas para *otd*

(A) Mapa genético de *Otd* y sus secuencias reguladoras descritas hasta el momento. (B) Discos L3 mostrando los patrones de expresión (G-TRACE) de las secuencias reguladoras indicadas. Para este trabajo se analizaron las secuencias descritas en la colección Janelia (magenta en el mapa génico) y parte de los elementos reguladores procedentes de las líneas VT (Vienna; cian las analizadas/rojo oscuro las pendientes de analizar). Además, también se analizó la línea oc7 (fragmento de oc2; verde). En rojo aparecen otras líneas descritas no analizadas.

En resumen, podemos decir que, a pesar de los esfuerzos empleados, a día de hoy no hemos conseguido descifrar el mecanismo de regulación que dirige la expresión de *Optix*.



# CAPITULO 4

## Otros factores implicados en el desarrollo del CO: el complejo Iroquois y la vía EGFR

En la antena, como en otros disco imaginales, el borde anterior-posterior (AP) es la primera restricción de linaje que aparece. Esta restricción es seguida de la generación de un borde dorso-ventral (DV), el cual resulta en la subdivisión de los discos en compartimento dorsal y ventral [revisado en (Blair, 1995; 2001)]. Por el contrario, el disco de ojo no muestra una restricción estricta de linaje AP (Morata and Lawrence, 1978) y el borde DV es la primera división que se observa al final del segundo estadio larvario (Baker, 1978; Cho and Choi, 1998; Domínguez and de Celis, 1998) .

Los genes del complejo Iroquois (Iro-C), los cuales actúan corriente abajo del gen selector de la población dorsal del ojo *pannier* (*pnr*), un factor de transcripción (FT) GATA-1 (Maurel-Zaffran and Treisman, 2000) , también funcionan como selectores dorsales (Cavodeassi et al., 1999; Domínguez and de Celis, 1998; McNeill et al., 1997; Pichaud and Casares, 2000). El Iro-C codifica tres proteínas con homeodominio de la clase TALE, Araucan (Ara), Caupolican (Caup) y Mirror (Mirr) (Gomez-Skarmeta et al., 1996; McNeill et al., 1997; Netter et al., 1998). Desde el final del primer estadio larvario, las tres proteínas del Iro-C se acumulan en la mitad dorsal del disco de ojo, restringiendo la expresión de *fringe* (*fng*) al territorio ventral (Cho and Choi, 1998; Cavodeassi et al., 1999). Fng es una glicosiltransferasa que modula la respuesta de Notch (N) con sus ligandos Serrate (Ser) y Delta (DI) [revisado en (Irvine and Vogt, 1997)], limitando la activación de la vía de N al borde DV. Esta activación constituye un centro de organización esencial para el crecimiento del disco y para el establecimiento de la polaridad de los omatidios (Cho and Choi, 1998; Domínguez and de

Celis, 1998; Papayannopoulos et al., 1998). Durante el tercer estadio, sin embargo, la expresión de los tres genes *Iro-C* cambia. La expresión de *ara* y *caup* se mantiene en la mitad dorsal del disco de ojo, mientras que la expresión de *mirr* aparece restringida a la cabeza dorsal en un patrón complementario [Fig. 4.1B; (Yorimitsu et al., 2011)].

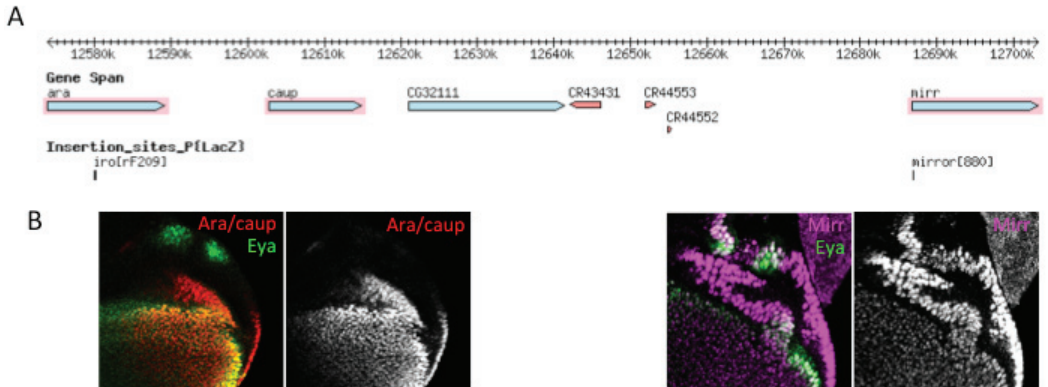


Figura 4.1. Los genes del complejo Iroquois se expresan en dominios complementarios en la región dorsal del disco de ojo

(A) Mapa genético de los genes del complejo Iroquois. (B) Discos de tercer estadio larvario, obtenidos a partir de las inserciones señaladas en el panel superior. La expresión de *Eya* (verde) marca la localización de los primordios del sistema visual. En este estadio la expresión de *Ara* y *Caup* se extiende por el compartimento dorsal del territorio del ojo, mientras que *Mirr* aparece restringido en el primordio de la cabeza dorsal, formando un patrón complementario.

El laboratorio de Nakagoshi describió recientemente que la acción conjunta de los genes *Iro* era necesaria, al final del segundo estadio larvario y principios del tercero, para marcar la identidad dorsal del primordio de la cabeza que deriva de esta región, mediante la activación gradual de *orthodenticle* (*otd*) y *defective proventriculus* (*dve*) (Kiritooshi et al., 2014), un gen homeobox implicado en diferentes funciones, incluyendo la especificación de la cabeza (Nakagoshi et al., 1998; 2002; Nakagoshi, 2005; Johnston et al., 2011; Nakagawa et al., 2011; Yorimitsu et al., 2011). En estadios posteriores, sin embargo, cuando la expresión de *ara/caup* queda restringida al territorio dorsal del ojo y la de *mirr* a la cabeza dorsal, *Ara/Caup* evitan la expresión de *dve* en el territorio del ojo, mientras que *Mirr* no parece influir en su expresión, como muestran los clones de pérdida de función de *mirr* inducidos durante la segunda mitad del tercer estadio (Kiritooshi et al., 2014). Es decir, los genes *ara* y *caup* son reprimidos por *dve* para permitir el desarrollo del CO. Sin embargo, la expresión de *mirr* permanece y está asociada al CO.



Ante estos hechos, nos preguntamos si *mirr* podría tener una función específica durante el desarrollo del CO, ya que su expresión restringida en este dominio se mantiene hasta, al menos, el final de la vida larvaria. Para ello, indujimos en todo el CO la pérdida de función de *mirr* mediante una línea RNAi específica (*oc2>mirrorRNAi* o *MirrKD*). En estas condiciones, las cabezas mostraban la ausencia o reducción en el tamaño de los ocelos, tanto el anterior como los posteriores. En su lugar observamos que aparecían algunas quetas en la región de los ocelos (Fig. 4.2B flecha), sugiriendo que la pérdida de los ocelos conllevaba a una extensión de la cutícula interocelar. El tamaño del CO, sin embargo, se aproximaba al de la condición salvaje (Fig. 4.2A y B). La pérdida ocelar estaba asociada a una reducción severa de los niveles de *eya* en discos L3 tardíos (Fig. 4.2C y D) y la extensión de la cutícula observada en los adultos parecía corresponderse con la expansión del dominio libre de expresión de CiA (Fig. 4.2D corchete). La especificación de la RIO depende de la expresión de *en* y la consecuente represión de la vía de Hh (ver capítulo 1) en este dominio. Así, una posible explicación a los resultados obtenidos podía estar asociada a la des-represión de *en* en esta región. Para comprobarlo, indujimos la pérdida de *mirr* en un fondo *enZ*. En adultos *oc2>mirrRNAi*, *enZ* la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa reveló una extensión del dominio de *en* con respecto a la condición salvaje (Fig. 4.3). Estos datos indicaban que *mirr* estaba implicado en la restricción de la expresión de *en* en la futura RIO. Sin embargo, el hecho de que *mirr* se expresase a lo largo de todo el CO, incluyendo el dominio central, sugería, muy probablemente, la implicación de un mecanismo indirecto. De lo contrario, su presencia en las células centrales debería suponer la represión de *en*.

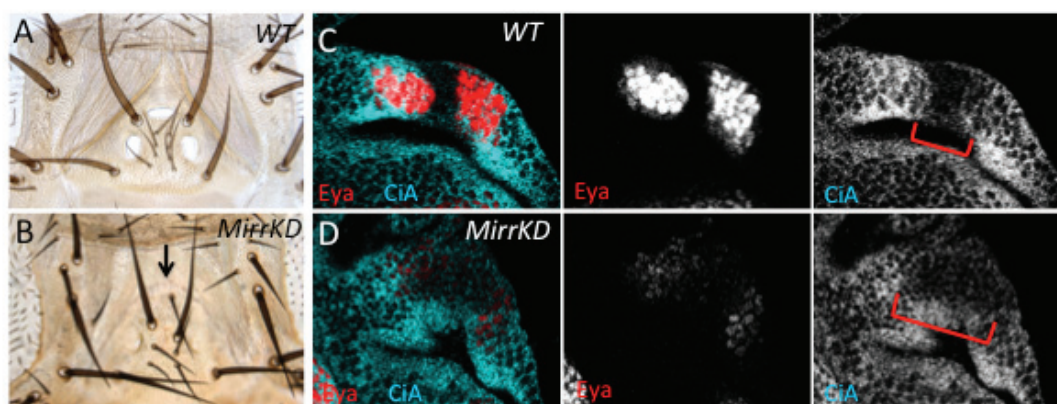


Figura 4.2.

Figura 4.2. La pérdida de expresión de *mirr* en el CO, conduce a la pérdida específica de los ocelos

(A-D) Cabezas adultas (A, B) o discos L3 (C, D) de condición salvaje (A, C) y *oc>MirrRNAi* (*MirrKD*) (B, D). La pérdida de *mirr* evita el desarrollo de los ocelos específicamente, en su lugar, se especifica cutícula interocelar, con la aparición de micro-quetas ectópicas (B, flecha). Esta pérdida está asociada a una reducción en los niveles de expresión de *Eya* y a una expansión del dominio libre de expresión de *CiA* (D, corchete).

Para comprobar si la expresión de *mirr* se encontraba regulada por Hh y/o Otd, mediando de alguna manera entre éstos y la activación de los genes diana, o actuaba en paralelo, examinamos la expresión de *mirr* utilizando la línea reportera *mirr880Z* en discos L3 *OtdKD* y *HhKD*. En ninguna de las dos situaciones observamos pérdida de la expresión de *mirr* (Fig. 4.3C-D), sugiriendo que su papel en la especificación de los ocelos ocurría en paralelo a la función de *otd* y de la vía de Hh.

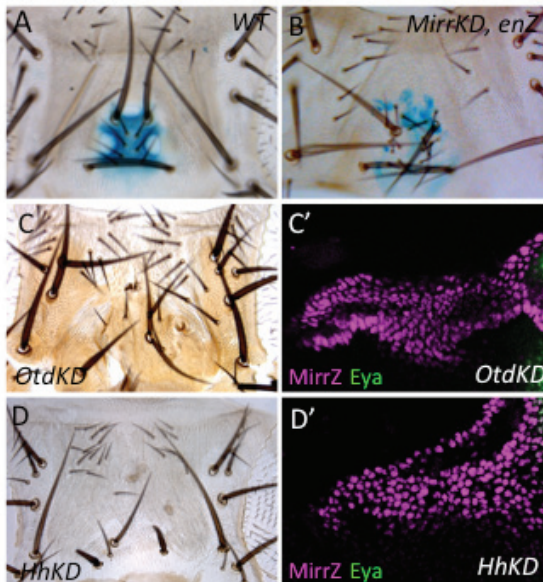


Figura 4.3. *mirr* regula la expresión de en paralelo a *otd* y *hh*

(A, B) Cabezas adultas de condición salvaje (A) y *MirrKD* (B). La actividad de la  $\beta$  galactosidasa (*enZ*) muestra una desrepresión de *en* en la región de los ocelos. (C-D') Región dorsal de moscas adultas (C, D) o discos de tercer estadio (C', D') *OtdKD* (C, C') y *HhKD* (D, D') en un fondo *Mirr-Z* (magenta) y teñidos para *Eya* (verde). En ningunas de las dos situaciones se ve afectada la expresión de *mirr*.

Son diferentes los contextos en los que la actividad de los genes Iro se ha relacionado con la interacción antagónica entre la vía EGFR y Decapentaplegic (Dpp). Por ejemplo, durante el desarrollo del disco de ala, esta actividad opuesta entre EGFR y Dpp restringe la expresión del Iro-C al futuro notum (Cavodeassi et al., 2002; Zecca and Struhl, 2002; Wang et al., 2010). En el CO, la pérdida de EGFR resulta en adultos que fenocopian al de las cabezas *MirrKD*. Es decir, pierden los ocelos, mientras que la cutícula interocelar permanece, aunque con las quetas desorganizadas.





zadas [Fig. 4.4A; (Amin et al., 1999)]. Con estos antecedentes, decidimos comprobar si un mecanismo similar al descrito en el disco de ala podría estar actuando en el CO. Para ello, indujimos el bloqueo de la vía EGFR (*oc2>DERDN; DERKD*) en un fondo *mirrZ* y analizamos la expresión de P<sup>Mad</sup>, como marcador de la actividad de la vía Dpp. En discos *DERKD* ni la expresión de *mirr880Z* ni la de P<sup>Mad</sup> se vieron alteradas, de lo que dedujimos que la vía EGFR no era requerida para regular ni la expresión de *mirr* ni la actividad de la vía de Dpp (Fig. 4.4B-C).

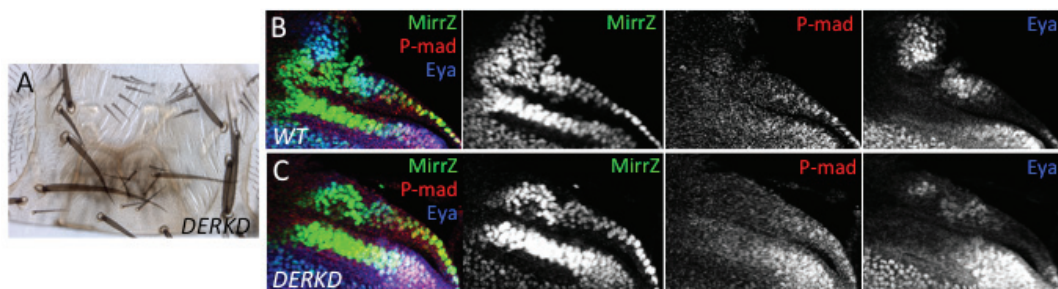


Figura 4.4. La pérdida de los ocelos en ausencia de la vía EGFR no se produce mediante la regulación de *mirr*

(A) Región dorsal de moscas adultas sobre-expresando una forma dominante negativa del receptor EGF (*DERKD*), las cuales pierden específicamente los ocelos, mientras que la RIO permanece, aunque con las quetas desorganizadas. (B, C) Discos L3 de larvas salvaje (B) o *DERKD* (C) teñidas para  $\beta$  galactosidasa (verde), P<sup>mad</sup> (rojo) y Eya (azul). El bloque de la vía EGFR reduce la expresión de *eya* sin alterar el patrón de *mirr* ni P<sup>mad</sup>.

En resumen, los datos mostrados sugieren que *mirr*, gen perteneciente al complejo Iro, es necesario para la especificación de los ocelos. En su ausencia, éstos son reemplazados por cuticular interocelar mediante la des-represión de *en*. Sin embargo, hasta el momento no hemos podido determinar el mecanismo de regulación que conlleva a esta situación, pero podría implicar a la vía de Wg, mostrando un mecanismo similar al descrito en el territorio de ojo en estadios más tempranos (Hebelein et al., 1998). Por otra parte, la vía EGFR también parece ser determinante para el correcto desarrollo de los ocelos específicamente, aunque no parece hacerlo a través de *mirr* como en otros contextos. Una posibilidad, sin embargo, no contemplada hasta ahora, podría implicar la regulación inversa: es decir, de la vía EGFR por *mirr*.

# Discusión





El origen evolutivo de los ojos, órganos altamente complejos y especializados, ha sido objeto de debate y controversia desde la aparición de las primeras teorías sobre la selección natural como mecanismo evolutivo. Ya en *El Origen de las Especies*, Charles Darwin tuvo dificultades para explicar el origen de los órganos visuales simplemente por variación y selección de aquellos individuos portadores de las variantes beneficiosas (Darwin, 2010). Tradicionalmente, se ha considerado que los diferentes tipos de ojos tienen un origen evolutivo independiente (Salvini-Plawen and Mayr, 1977). Por un lado, la morfología del ojo compuesto de artrópodos, formado por múltiples facetas (omátidos), cada una de ellas con su propia lente, y la de los ojos de lente única de vertebrados y cefalópodos (moluscos), contruidos de manera similar a una foto-cámara, es tan diferente que no se puede establecer homología estructural. Por otro lado, el modo de desarrollo entre ojos tipo cámara difiere: el ojo de vertebrados se forma a partir de una evaginación del cerebro, mientras que el de moluscos lo hace a partir de una invaginación del ectodermo [revisado en (Gehring, 2004)]. Sin embargo, el hallazgo de que un mismo gen, *Pax6*, podía inducir ojos ectópicos tanto en ratones como en *Drosophila* [revisado (Gehring and Ikeo, 1999)], sugirió que este factor funcionaba ya como gen maestro, instruyendo una identidad genérica de ojo, en el último ancestro común de vertebrados e insectos. De hecho, *Pax6* se ha asociado con el desarrollo del ojo de todos los animales bilaterales estudiados hasta la fecha, sugiriendo un posible origen monofilético de los órganos visuales (Gehring and Ikeo, 1999). El hecho además de que no solo la función de *Pax6* se encuentra conservada en la evolución del ojo, sino también la de los factores de transcripción (FTs) de segundo orden, *Six/so* (*Six1/so* y *Six3/Optix*), y la expresión de *eyes absent* (*eya*) y *dach-sund* (*dac*), apoya la hipótesis de un origen monofilético.

Una de las aproximaciones más comunes para reconstruir el programa regulatorio arquetípico de los órganos visuales es comparar estructuras y procesos homólogos entre diferentes especies. Sin embargo, éstos a veces se encuentran muy distanciados filogenéticamente. Una segunda aproximación para inferir estos mecanismos ancestrales es la comparación de estas estructuras homólogas dentro de una misma especie. Esta estrategia ha sido usada, por ejemplo, para investigar la divergencia en el desarrollo de apéndices homólogos seriados (Averof and Patel, 1997; Casares and Mann, 1998; Giorgianni and Patel, 2004; Jockusch et al., 2004). *Drosophila* posee dos conjuntos de ojos: los ojos compuestos y

los ocelos u ojos simples. Este hecho permite el estudio de ambos tipos divergentes de ojo en la misma especie. Como paso previo a esta comparación era necesario completar la red de regulación génica (RRG) que controlaba el proceso de especificación de los ocelos, el objetivo principal de esta tesis. Cada ocelo consta de una lente (córnea) y una capa de células foto-receptoras, representando un diseño de ojo simple tipo foto-cámara. El desarrollo ocelar, por tanto, ofrece un punto de comparación con el ojo compuesto, permitiendo así la extracción de principios comunes, y quizás generales, activos durante el desarrollo de órganos visuales estructuralmente divergentes. Sin embargo, no debemos obviar que el órgano visual como sistema funcional no puede desarrollarse como una estructura aislada, sino que tiene que estar integrado en la cabeza (*patterning*) y conectado correctamente al cerebro (diferenciación).

Trabajos previos, incluyendo el trabajo de Anette Brockmann en nuestro laboratorio, habían permitido identificar los eventos regulatorios principales, tanto positivos como negativos, que llevaban a la activación de los genes determinantes de la retina (GDRs) *eya* y *so* durante el desarrollo del CO (Royet and Finkelstein, 1996; Blanco et al., 2009; 2010; Brockmann et al., 2011). Por un lado, la acción de *toy* y la vía de Hh, actuando en paralelo, inician la expresión de ambos genes (Blanco et al., 2010; Brockmann et al., 2011). Esto va seguido de un bucle de mantenimiento entre Eya y So (probablemente implicando la formación de un complejo proteína-proteína). Por otro lado, la acción negativa de *homothorax* (*hth*) limita la extensión del dominio de Eya/So (Brockmann et al., 2011). Sin embargo, el hecho de que la sobre-expresión de *hth* dentro del CO (donde *toy* y *hh* están activos) no pueda bloquear completamente la expresión de los GDRs, sugiere la acción de otros factores con actividad represora dentro del propio complejo. De otro modo, la expresión en el CO de *toy* (Blanco et al., 2010; Brockmann et al., 2011) así como la actividad de la vía de Hh (Fig. 1.3A), deberían asegurar la expresión de *eya/so* en un único dominio homogéneo. De hecho, a mitad del tercer estadio ésta era la situación observada (Fig. 1.3B). Este patrón evoluciona, no obstante, a dos parches de expresión separados por un dominio en el que no se observa ni expresión de *eya/so* ni actividad de la vía de Hh (futura RIO; Fig. 1.3C). Esto suponía que, hasta la fecha, los modelos que describían las interacciones genéticas implicadas en el desarrollo ocelar y sus estructuras asociadas no ofrecían una explicación satisfactoria a la formación de dos dominios independientes de expresión de *eya/so*. Esto hizo que durante el desarrollo de la tesis el objetivo inicial se perfilara, para final-

mente centrarnos en intentar comprender el mecanismo por el que se generaba el patrón final (aOc-RIO-pOc) y como éste se integraba dentro del proceso de estructuración (*patterning*) de la cabeza dorsal de *Drosophila*.

### 1.- *en*, gen diana de la vía de Hh, es requerido para la especificación de la RIO

Los ocelos se localizan en los vértices de una cutícula triangular en la cabeza dorsal adulta. El conjunto de los ocelos más la región interocelar (RIO) que los separa (y que incluye las quetas sensoriales asociadas a dicha región) conforman el llamado CO. El trabajo del laboratorio de Finkelstein demostró la importancia de la vía de señalización de Hedgehog (Hh) no solo en el desarrollo de los ocelos sino también en la cutícula que los alberga. La falta de función de la vía de Hh en esta región conlleva la pérdida de estas estructuras, las cuales son reemplazadas por la cutícula del tejido adyacente, la frente. Por el contrario, la expresión ectópica de Hh en localizaciones mas laterales de la cabeza, es suficiente para inducir la formación de un nuevo CO (Royet and Finkelstein, 1996) indicando que la vía de Hh es necesaria para la especificación de los dos tipos de tejidos: los ocelos (mediante la activación de *eya*, junto con *toy*) y la cutícula interocelar o RIO (aOc-RIO-pOc).

En esta tesis hemos visto cómo *engrailed* (*en*), que codifica un FT con homeodominio y portador, además, de un dominio represor (Jaynes and O'Farrell, 1991), es activado por la vía de Hh en las células centrales, donde ambos genes se co-expresan (Royet and Finkelstein, 1996). La expresión de *en* en esta región es necesaria para la especificación de la RIO. De lo contrario, las moscas adultas muestran un gran ocelo fusionado. Esta transformación cutícula-ocelo ocurre debido a que *en* actúa como regulador negativo de la vía, mediante la represión transcripcional de *ci* y *ptc*, formando un bucle de retroalimentación crítico para la obtención del patrón final. En consecuencia, la expresión de *eya/so* sólo puede mantenerse en dos dominios laterales separados por la RIO (Fig. 1.4). El hecho de que *en* bloquee la vía de señalización de Hh, necesaria para iniciar su expresión, hace que la lectura de la señal en las células que expresan en sea transitoria. Esta lectura temporal hizo cuestionarnos la dificultad que supondría alcanzar niveles altos y estables de expresión de *en* suficientes para apagar la vía de señalización e inactivar así *eya*. Sabíamos que esta inactivación era necesaria para la correcta especificación de la RIO: niveles altos y uniformes de expresión de *ci* resultaban





en la co-expresión de *eya* y *en* en todo el dominio ocelar. En esta situación *eya* actuaba de manera epistática sobre *en* y el tejido ocelar era el único especificado (Fig. 1.5). Por tanto, sólo podría establecerse una RIO estable sí, una vez iniciada la expresión de *en* por la señalización de Hh, un mecanismo independiente a la propia vía mantuviese *en* a altos niveles. Tal transición, donde una expresión inducida por una señal pasa a un modo independiente de mantenimiento, ha sido descrita para *en* durante la segmentación embrionaria de *Drosophila* (Heemskerk et al., 1991). Nosotros proponemos que, en la región ocelar, esta transición requiere de la vía de señalización de Notch mediante su ligando DI (pero no Ser). No hemos determinado, sin embargo, el mecanismo molecular de este mantenimiento de *en*, pero podría implicar PREs (*del inglés Polycomb Response Elements*) en el *locus* de *en* (Kwon et al., 2009; Ekas et al., 2006).

## 2.- La vía de señalización de Hh y la activación de sus genes diana *eya* y *en*

La expresión de *eya/so* y *en*, a lo largo del CO, necesaria para definir las poblaciones que formarán los ocelos y la RIO, respectivamente (aOc-RIO-pOc) depende, por tanto, de la vía de señalización de Hh (Royet and Finkelstein, 1996; Blanco et al., 2009; Brockmann et al., 2011). Pero, ¿cómo regula la vía de Hh destinos celulares alternativos? Como se mencionó previamente, en muchos sistemas en desarrollo el establecimiento de estos patrones requiere de la acción de los llamados morfógenos, los cuales forman un gradiente de concentración que permite la respuesta diferencial de los genes diana [revisado en (Tabata and Takei, 2004; Rogers and Schier, 2011)]. Por ejemplo, durante el desarrollo del disco de ala, Hh, producido en el compartimento posterior del disco, genera un gradiente de concentración que es leído por las células del compartimento anterior (que son competentes para leer esta señal). El resultado es un conjunto de patrones de expresión génica, cuya extensión depende de la sensibilidad de cada gen a diferentes concentraciones de Hh. Así, genes de baja sensibilidad se activan sólo en las células adyacentes al compartimento posterior, donde la concentración de Hh es máxima. Genes con sensibilidad mayor se expresarán hasta una mayor distancia del borde de compartimento (Felsenfeld and Kennison, 1995). Entre los genes controlados por Hh se encuentran *decapentaplegic (dpp)*, *patched (ptc)* y *en* (Capdevila et al., 1994; Tabata and Kornberg, 1994; Sanicola et al., 1995). *en* se expresa en las células más próximas al compartimen-



to posterior [además de en el propio compartimento P; (Blair, 1992)] y sus niveles decrecen rápidamente al distanciarse de este. La expresión de *ptc* se extiende en un dominio más amplio que el de *en* y decrece gradualmente. El dominio de *dpp*, por su parte, es similar al de *ptc*, pero difiere en que sus niveles son bajos en las células que expresan *en* (Strigini and Cohen, 1997). El establecimiento diferencial de estos patrones de expresión mediante la vía de Hh es necesario para la correcta formación de la región central del ala (Hepker et al., 1997).

Dado que en el CO: (1) *en* se expresa con un patrón similar al de *hh*, con tan solo algunas células *en* positivas que no expresan *hh* en los bordes del dominio (Fig. 1.2A); (2) *ptc* se expresa en dos dominios flanqueando la RIO y su expresión decrece al alejarse de dicha región de manera exponencial (Fig. 1.3C-C') y; (3) la expresión de *eya* se extiende de manera homogénea en ambos dominios (Fig. 1.1C), planteamos inicialmente un mecanismo de regulación en el cual la vía de Hh actuaba como morfógeno e instruía así los diferentes destinos celulares. De este modo, propusimos que la traducción del gradiente de Hh generaba una asimetría inicial provocando que sólo las células que recibían niveles altos de señal iniciaran la expresión de *en*, esto es, sólo en células productoras de Hh (RIO) y sus células adyacentes. Sin embargo, la expresión de *eya*, gen diana de alta sensibilidad, podía iniciarse en todo el CO, pero dado que en actuaba como regulador negativo de la vía, ésta solo podía producirse en la células libres de *en*, permitiendo así el establecimiento del patrón final (ver capítulo 1; (Aguilar-Hidalgo et al., 2013). Para comprobar esta hipótesis se realizó un modelo matemático que recogía el razonamiento genético planteado (ver apéndice 1). El modelo ayudaba a explicar la dinámica de cómo destinos celulares alternativos eran controlados por la vía de Hh, partiendo de un dominio de expresión de *hh* introducido *de facto* en las células centrales.

Sin embargo, la expresión de *hh* en el CO es iniciada, al principio del tercer estadio larvario, por la acción secuencial de Wg y Otd, resultando en un dominio donde los tres genes se co-expresan [Fig. 2.1D; (Royet and Finkelstein, 1996)]. Esto es, *hh* tiene una expresión generalizada en la región prospectiva del CO. Una vez iniciada su expresión, *hh* es necesario para el funcionamiento del *enhancer* auto-regulador de *otd*, *oc7* (Fig. 2.5). Este *enhancer* eleva presumiblemente los niveles de Otd en la región medial del disco, lo que resultaría en la represión de *wg* en esta región (Royet and Finkelstein, 1995; Blanco et al., 2009), quedando así confinada la transcripción de *wg* a dos parches en las que serán las

regiones más laterales de la cabeza [Fig. 1.1G; (Royet and Finkelstein, 1996)]. Este mecanismo de regulación iniciado por *Wg* debería resultar, por tanto, en la co-expresión de *hh* y *otd* en toda la región medial, o CO. En nuestro modelo, la localización de la fuente en sólo las células centrales era requerida para que el patrón final fuese asimétrico. Una expresión de *hh* a lo largo del CO debería asegurar una actividad de la vía similar en todo el sistema, provocando la activación, primero de *eya*, y posteriormente de *en*, en todas las células. La expresión de *en*, entonces, bloquearía la vía impidiendo la especificación de los ocelos y como consecuencia, el tejido interocelar sería el único especificado. De hecho, la expresión de *eya* aparece a mitad del tercer estadio, a lo largo de todo el complejo de manera homogénea, sugiriendo que la especificación de los ocelos comienza a partir de una actividad de la señal semejante en todas las células. Sin embargo, la expresión de *en* solo ocurre en el dominio central en fases posteriores. Esto quiere decir que la transición en el patrón de expresión de *hh* es clave para la generación de los diferentes dominios que conforman el CO.

### 3.- Dinámica de la transcripción de *hh*

La evolución observada en la expresión de *hh*, que pasa de expresarse en todo el complejo a expresarse únicamente en las células centrales, no parece deberse, al menos en exclusiva, a una re-organización celular. El linaje de una línea *hhGAL4* que reproduce el patrón de transcripción de *hh* es más extenso que el patrón final, indicando que durante el desarrollo del CO, la transcripción de *hh* se pierde en parte del complejo (Fig. 2.8). La expresión dinámica de *hh* sugiere, por tanto, la participación de factores adicionales. Diferentes evidencias han situado a *hh* como gen diana de *en* durante la segmentación embrionaria (Lee et al., 1992; Mohler and Vani, 1992; Tabata et al., 1992). Una dependencia similar se ha descrito en el compartimento posterior del disco de ala. En la cabeza dorsal, la expresión ectópica de *en* es suficiente para activar la transcripción de *hh* de manera autónoma celular, mientras que su pérdida de función, específicamente en la RIO, reduce significativamente los niveles de expresión de *hh* (Fig. 2.9 y 2.10). Estos datos sugieren que *en* está implicado en la regulación de *hh* y que, presumiblemente, es el responsable de su expresión localizada en las células centrales. Esto podría explicar, en parte, por qué *en* es capaz de inducir ocelos ectópicos en un fondo mutante para *otd* (Royet and Finkelstein, 1995), aunque para ello, uno debe

asumir efectos no autónomos: la expresión ectópica de *en* activaría la expresión de *hh*, y ésta a través de su vía provocaría la activación de *eya* en las células vecinas.

Por otra parte, que *en* regule la expresión de *hh* en la RIO no justifica su pérdida en los dominios adyacentes. En este sentido es interesante resaltar que el mantenimiento de la vía de Wnt en el CO no solo actúa negativamente evitando la expresión de los genes diana de la vía de Hh, sino que también expande el dominio de expresión de *hh*, sugiriendo un papel positivo en su regulación temprana (Fig. 2.3). Así, nosotros proponemos un escenario en el que la acción combinada de Wg y Otd inician la transcripción de *hh*. Esto provocaría la elevación en los niveles de expresión de Otd que actúa como represor de *wg* y lo elimina del CO. Esta represión de Wg permitiría, por un lado, la activación de los genes diana *eya* y *en*, pero atenuaría, por otro, la expresión de *hh*. En este momento la activación de *en*, que aparece restringida a la RIO durante todo el desarrollo, fijaría la expresión de *hh* en el dominio central. De manera alternativa, se podría suponer la presencia de represores a ambos lados de la RIO, aunque hasta la fecha no hay indicios que sugieran tal actividad represora sobre la transcripción de *hh* en esta región.

Esta hipótesis podría explicar la dinámica en el patrón de *hh*. Sin embargo, en el contexto global de la especificación del CO, no hace más que trasladar el problema hacia otro punto de la red. Dado que *en* es un gen diana de la vía de Hh, la cual está inicialmente activa por todo el CO, ¿por qué la transcripción de *en* se restringe a la región central de éste, la RIO?

#### **4.- *Six3/Optix* como sistema anti-represor para establecer la identidad anterior**

Ya comentamos anteriormente la importancia del gen *Six3/Optix* durante el desarrollo del ojo tanto en invertebrados como en vertebrados. Su expresión temprana en el ojo en formación, su capacidad para iniciar el programa genético de diferenciación de tejido ocular en experimentos de expresión ectópica, así como la reducción en el tamaño del ojo o ausencia de los mismos en mutantes de pérdida de función, lo sitúa como uno de los GDRs (Toy et al., 1998; Seimiya and Gehring, 2000). Sin embargo, su papel durante el desarrollo del CO, donde se expresa específicamente en

la región anterior (Fig. 3.1A), no había sido analizado. Los experimentos de pérdida de función, los cuales afectan al desarrollo del ocelo anterior y no al ocelo posterior o la RIO (Fig. 3.1B), sugieren un papel importante en la formación de esta estructura.

En vertebrados, Six3 y Six6 interaccionan con miembros de la familia Groucho formando un complejo represor, necesario para promover el crecimiento y diferenciación del ojo (Zhu et al., 2002; López-Ríos et al., 2003). En *Drosophila*, el laboratorio de Kumar ha demostrado recientemente que la capacidad de *Optix* de inducir ojos ectópicos requiere de un mecanismo represor que bloquee el programa genético endógeno del tejido (Anderson et al., 2012). Aquí, hemos investigado su función mediante experimentos de ganancia y pérdida de función durante el desarrollo del CO y su análisis revela que, como en otros contextos, la función de *Optix* se ajusta a la de un represor transcripcional. *Optix* es necesario, al menos durante el tercer estadio larvario, para reprimir la expresión de *en* (regulador negativo del destino celular ocelar) en el ocelo anterior y delimitar así la población precursora del ocelo (*eya+/en-*) de la población precursora de cutícula interocelar (*eya/en+*), como muestran las moscas adultas crecidas en ausencia de *Optix*, las cuales presentan una extensión del dominio de *en* y la reducción (y a veces pérdida) del ocelo anterior (Fig. 3.3). Este mecanismo anti-represor difiere del descrito en ratones y *Tribolium*, en el que la pérdida de Six3 conduce a la des-represión de Wnt1/wg, regulador negativo de la región anterior del cerebro (Lagutin et al., 2003; Posnien et al., 2011). No obstante, y a pesar de que nuestros experimentos muestran que Wg y Optix no interaccionan en estas fases del desarrollo, no descartan la posibilidad de que dicha interacción ocurra en otros estadios o en otros contextos en los que también se requiere de la expresión de Optix.

De hecho, son numerosas las evidencias que asocian a Six3/Optix con el desarrollo de las estructuras más anteriores del cuerpo, incluyendo mandíbula, maxilares y la región anterior del cerebro (Loosli et al., 1998; Bovolenta et al., 1998; Wallis et al., 1999; Lowe et al., 2003; Lagutin et al., 2003; Coiffier et al., 2008; Wei et al., 2009; Steinmetz et al., 2010; Posnien et al., 2011). En larvas tempranas de *Drosophila*, la pérdida de función de Optix resulta en la ausencia de las estructuras derivadas del labro y de las piezas bucales [Fig. D.1A-A'; (Coiffier et al., 2008)], revelando su importancia en el desarrollo de las mismas. Por otra parte, la ausencia de los genes HoxCP en la región anterior de cada segmento deriva en el desarrollo de un tipo de cutícula típico de la cabeza, y su forma-

ción ectópica ha sido relacionada recientemente con la des-represión de *Optix* en dichas regiones (Coiffier et al., 2008). Curiosamente, la sobre-expresión de *Optix* a lo largo de toda la cabeza dorsal (*wg2.11>OptixS1*), transforma tanto la frente como el CO en un tipo de cutícula semejante a la encontrada en las regiones más anteriores de la cabeza adulta (Fig. D.1B). Además, *Optix* se expresa en la región anterior del disco labial, en un patrón complementario al de *en* en la región proximal (Fig. D.1B asterisco). En condiciones *OptixKD* (*NP2631>OptixRNAi*), los adultos presentan defectos en el cípeo-labro, aunque sin daños aparentes en la proboscis (Fig. D.1C-C' y D-D'), estructura derivada del disco labial. Una situación similar observamos cuando sobre-expresamos en mediante la misma línea Gal4 (*NP2631>en*), aunque con daños en las proboscis (Fig. D.1F-F'), sugiriendo que es posible teorizar con un mecanismo similar al descrito en el CO actuando durante el desarrollo de otras estructuras, aunque sería necesario un estudio genético más detallado para afirmar esta cuestión.

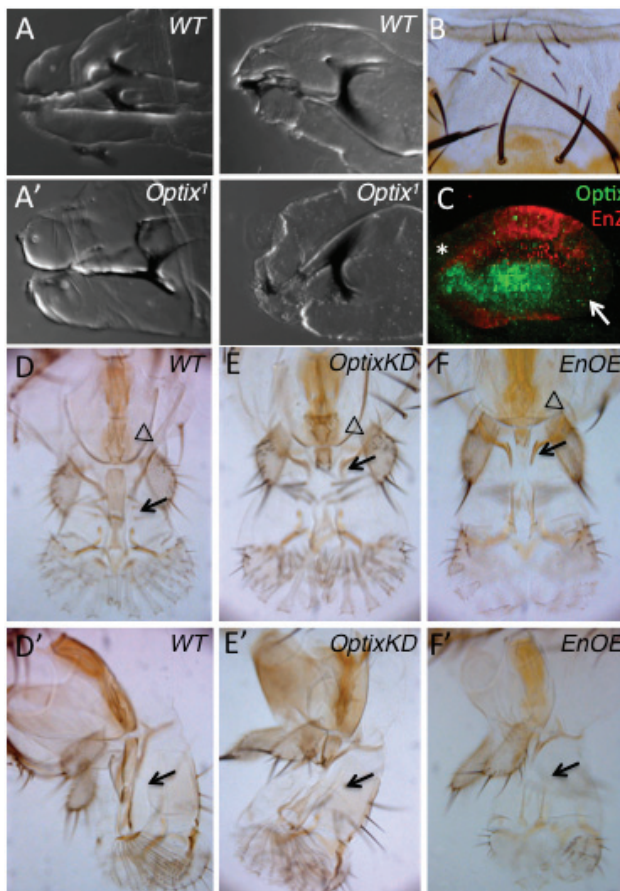


Figura D.1. Posible papel de *Optix* en la organización de las estructuras anteriores

(A, A') Cutículas de larvas L1 enfocando la región anterior en la condición salvaje (A) y larvas homocigóticas para un alelo nulo de *Optix* (*Optix1*). La ausencia total de actividad de *Optix* produce la malformación o ausencia de la parte más anterior de las piezas bucales. (B) La sobre-expresión de *Optix* en toda la cabeza dorsal (*wg2.11>OptixS1*) transforma todo el tejido en un tipo de cutícula característico de las regiones más anteriores de la cabeza. (C) Disco labial mostrando la expresión de *Optix* (verde) y *en* (*enZ*; rojo). La expresión de ambos genes es complementaria en el extremo proximal del disco (asterisco), mientras que ninguno de ellos se expresa en el extremo distal (flecha). (D-F') Proboscis y cípeo-labro de moscas adultas salvajes (D, D'), o sobre-expresando un RNAi contra *Optix* (E-E') o en (F, F') bajo el control del driver NP2631. Se muestran vistas frontales (D-F) y laterales (D'-F'). En ambas situaciones se pierde el labrum (flechas) y el cípeo muestra desorganización en la estructura (triángulo).



En resumen, los datos aquí presentados nos han llevado a proponer que el factor de transcripción Six3/Optix actúa, en las primeras fases de la especificación del CO, como gen de patrón, permitiendo la ‘selección’ de la población anterior mediante un mecanismo anti-represor sobre *en*. Dicha población, posteriormente, diferenciará en tejido ocelar (pudiendo requerir, de nuevo, la participación de Optix, aunque esto no se ha investigado) (Fig. 3.5). Este posible papel permisivo de Optix en el dominio anterior podría explicar, por un lado, por qué su expresión no es requerida para la formación del ocelo posterior, en el que uno podría asumir que tiene lugar un mecanismo similar pero llevado a cabo por un factor de patrón posterior. Por otro lado, explicaría la baja frecuencia con la que se obtienen ojos ectópicos en *Drosophila* cuando se fuerza su expresión en otros tejidos. Así, sólo 5 de las 224 líneas Gal4 utilizadas en un *screening* realizado por el laboratorio de Kumar mostraron formación de ojo, 4 de ellas en la antena (Weasner et al., 2007). Sería interesante, por tanto, analizar los efectos que produce la sobre-expresión de Optix cuando no resulta en ojo ectópico y comprobar si generan otras estructuras cefálicas incluyendo el sistema ocelar, el cual dado el pequeño tamaño y la menor pigmentación de los ocelos podrían haber pasado desapercibidas en el *screening* original. De hecho, el laboratorio de Gehring reportó, una década después de mostrar las primeras evidencias de la capacidad de Optix de inducir ojos compuestos en la antena (Seimiya and Gehring, 2000) su capacidad para inducir ocelos ectópicos cuando su expresión se fuerza en la cabeza dorsal (Gehring and Seimiya, 2010) sugiriendo que el contexto en el que ocurre la sobre-expresión es clave para entender la(s) posible(s) función(es) de *Six3/Optix* durante el desarrollo.

## 5.- El establecimiento de la asimetría en el complejo ocelar

Introducir en la red la represión de Optix sobre *en* en el dominio precursor del ocelo anterior ayuda a explicar por qué, a pesar de que Hh se exprese en todo el CO, la expresión de *en* aparece restringida en la RIO. Sin embargo, Optix no se expresa en el ocelo posterior, entonces ¿cómo se desarrolla éste? Es decir, ¿cómo se evita la expresión de *en* en este dominio?

Durante el tercer estadio larvario, *mirr*, gen del Iro-C, se expresa en la cabeza dorsal, mientras que *ara* y *caup*, resto de genes del complejo, lo hacen en la región dorsal del disco del ojo, formando un patrón comple-

mentario (Kiritooshi et al., 2014). La acumulación de Ara y Caup en el disco del ojo es necesaria para delimitar este primordio del de la cabeza dorsal mediante la represión de *dve* (Kiritooshi et al., 2014), mientras que *mirr* participa en el desarrollo del CO. En esta tesis hemos mostrado cómo su pérdida de función afecta específicamente a la formación de los ocelos a través de la des-represión de *en*, tanto en el dominio anterior como en el posterior. Sin embargo, no hemos podido determinar el mecanismo de regulación que deriva en esta situación, pero podría ser en paralelo a *otd* y a la vía de Hh. Por un lado, su expresión se mantiene cuando se reducen los niveles de *otd* o de actividad de la vía de Hh, indicando que no actúa corriente abajo de estos factores. Por otro lado, el hecho de que los adultos *MirrKD* especifiquen la RIO y el tamaño del CO no se vea alterado, sugiere que *mirr* tampoco se encuentra corriente arriba de *otd* y *hh*, ya que ambos genes son determinantes para el desarrollo de todo el sistema.

El hecho de que la expresión de *mirr* se extienda por todo el CO, sugiere que su mecanismo de actuación, además de ser independiente de *hh* y *otd*, podría ser indirecto, ya que *en* puede expresarse en presencia de *mirr* en la RIO. Curiosamente, el fenotipo de los adultos *DERKD* es similar al encontrado en las cabezas *MirrKD*. Es decir, pierden los ocelos mientras que la cutícula interocelar permanece. Sin embargo, la activación de *mirr* en esta región no parece depender de la vía EGFR tal y como ocurre en otros contextos, por ejemplo, en la especificación del notum en *Drosophila* (de Navascués and Modolell, 2007; Letizia et al., 2007). No obstante, sería interesante comprobar la situación opuesta: si *mirr* regula la vía EGFR.

A pesar de no haber podido determinar cómo *mirr* restringe la expresión de *en* en las células centrales del sistema, su falta de función es suficiente para expandir el dominio de *en* hacía ambos lados del CO. Sin embargo, su expresión continua en el sistema durante el proceso de especificación sugiere la implicación de un mecanismo adicional que establezca una asimetría en la lógica de la red de regulación. De otra manera, resulta difícil imaginar un escenario en el que la obtención de tres dominios bien delimitados (aOc-RIO-pOc) sea el resultado de la acción conjunta de factores que, expresados homogéneamente por todo el complejo, operan de manera diferencial dentro de éste.

De hecho, ya hemos mostrado como *Optix*, expresado específicamente en el dominio anterior, es necesario para el desarrollo del ocelo





anterior, pero no del posterior. Por ello, y con la intención de comprender cómo se originaba esta expresión diferencial decidimos analizar el mecanismo de regulación de *Six3/Optix*. Hasta la fecha, las evidencias disponibles situaban a Pax6 como posible candidato para regular su expresión durante el desarrollo del ojo (Lengler and Graw, 2001; Wargelius et al., 2003; Ostrin et al., 2006). En *Drosophila*, el gen Pax6 aparece duplicado en los genes parálogos *eyeless (ey)* y *twin of eyeless (toy)* (Czerny et al., 1999). La regulación de *Optix* por *ey* y/o *toy* es controvertida: aunque algunos autores han situado a *ey* como activador de *Optix* durante el desarrollo del ojo compuesto (Seimiya and Gehring, 2000; Gehring and Seimiya, 2010) otros han propuesto a *toy*, considerando que la expresión de *Optix* se mantiene en discos mutantes para *ey* (Seimiya and Gehring, 2000; Gehring and Seimiya, 2010). Sin embargo, ni *ey* se expresa en el CO (Punzo et al., 2002) ni *toy*, que sí está activo en esta región (Punzo et al., 2002) parece tener un efecto sobre la expresión de *Optix* (Fig. 3.6A), al menos durante las fases media y final de L3. Por otra parte, en vertebrados, *Six3* activa la expresión de *sonic hedgehog (shh)* en el telencéfalo y, una vez activo, *shh* regula la propia expresión de *Six3*, necesaria para establecer la estructuración dorsoventral de esta región. Sin embargo, durante el proceso de especificación del CO, esto es, durante la segunda mitad de estadios L3, la expresión de *Optix* no parece estar controlada por la vía de Hh (Fig. 3.6B), sugiriendo un mecanismo de regulación alternativo al observado en el telencéfalo en vertebrados.

En conclusión, los experimentos realizados hasta el momento no nos han permitido establecer un mecanismo de regulación para *Optix* y poder entender así cómo se origina la asimetría en el sistema. Sin embargo, uno podría especular que para que *Optix* se exprese, de manera exclusiva pero homogénea, en el dominio anterior se requiera de la acción de un factor (o factores) que de algún modo muestre expresión asimétrica en el CO y permitir así la expresión diferencial de otros factores corriente abajo.

El conjunto de datos y evidencias aquí presentados nos han llevado a plantear un red de regulación que ayuda a entender cómo ocurre el proceso de especificación y organización (*patterning*) del sistema ocelar. En este modelo *hh*, cuya expresión es iniciada por la acción conjunta de *wg* y *otd*, actúa, en primer lugar, como selector del CO, elevando, a través del *enhancer* auto-regulador *oc7* (Blanco et al., 2009), los niveles de *otd*, los cuales permiten la eliminación de *wg* de esta región. Esta pérdida de

*wg* es necesaria para el correcto desarrollo del CO ya que permite la activación de los genes diana de la vía de Hh, *eya* y *en*. En este contexto, *en* en la RIO funciona como regulador negativo de la vía de Hh a la vez que regula positivamente la transcripción de *hh*, estableciéndose un bucle de retroalimentación esencial para la correcta localización de los dominios de *eya* y para la especificación de la futura cutícula interocelar. Sin embargo, el hecho de que *hh* se exprese por todo el CO en las etapas iniciales del proceso de especificación, supone que el sistema debería derivar en la activación tardía de *en* en todo el complejo. Ante esta situación, nosotros proponemos un mecanismo anti-represor llevado a cabo por Six3/Optix que, al menos en el dominio anterior, evitaría la expresión de *en*, la cual quedaría restringida a la RIO. Aquí, *en* regula positivamente a *hh*, formando un dominio donde ambos genes se co-expresan.

En este modelo, la propiedad de morfógeno de Hh no es necesaria: en el CO, los dos destinos celulares, Eya/OC y En/RIO, son especificados por la vía de Hh, pero probablemente son el resultado de la dinámica transcripcional de *hh*, más que de su acción a distancia y dependiente de concentración. Esto no quiere decir que Hh no establezca un gradiente molecular y de señalización: de hecho, la concentración de Ptc, que actúa como *readout* de la vía, decae a ambos lados del dominio central de expresión de Hh de forma exponencial en los COs de L3 tardíos. Sólo que, en nuestro modelo, la acción de morfógeno no es necesaria para explicar la selección de destinos celulares y su distribución espacial. Estudios recientes han demostrado que *wg* no se requiere como morfógeno en la especificación del disco de ala, sino que su dinámica transcripcional de expresión a lo largo del desarrollo es suficiente para instruir distintos destinos celulares (Alexandre et al., 2014). Así, moscas crecidas con una forma de Wg anclada a la membrana (incapaz de difundir) presentan alas ligeramente menores pero bien desarrolladas. Sería interesante comprobar, por tanto, el efecto que una forma de Hh no difusible provocaría en el CO y ver si, como proponemos nosotros, podría desarrollarse con normalidad al menos hasta el estadio estudiado aquí.

Por otra parte, también hemos visto cómo *mirr* y la vía EGFR participan de este proceso regulando el desarrollo de los ocelos, específicamente. Así, la pérdida de función de ambos factores deriva en la pérdida de los ocelos, mientras que la RIO permanece. En el caso de *mirr*, esta regulación parece implicar la des-represión de *en* a ambos lados de su dominio endógeno de expresión, aunque hasta la fecha no hemos podido determinar el mecanismo que conlleva a esta situación.

En el CO la vía EGFR funciona a través de su ligando *vein* (*vn*), el cual se expresa de manera asimétrica en la región posterior (aunque es una molécula difusible, lo que podría explicar su efecto en el ocelo anterior) (Amin et al., 1999). En este sentido, es interesante recordar que en las fases finales de la especificación del CO, la vía de Notch, a través de su ligando DI, es requerida para el mantenimiento de la expresión de *en*, una vez ha sido iniciada por Hh (Aguilar-Hidalgo et al., 2013), mientras que Ser no parece estar involucrado en este mecanismo de mantenimiento. Sin embargo, durante la primera mitad de estadios L3, Ser se expresa específicamente en el dominio anterior del CO (Fig. D.2A). En estadios posteriores, su expresión se extiende justo hasta el borde que marca el inicio del ocelo posterior (Fig. D.2B) en un patrón similar al de *fng* (Fig. D.2C) y complementario al de DI (Fig. D.2D) y al de *vn* (Amin et al., 1999). Esto sugiere que las vías EGFR y N podrían estar actuando antagónicamente para especificar los ocelos y la RIO, respectivamente. No obstante, se requiere de un estudio más profundo para determinar esta posible interacción.

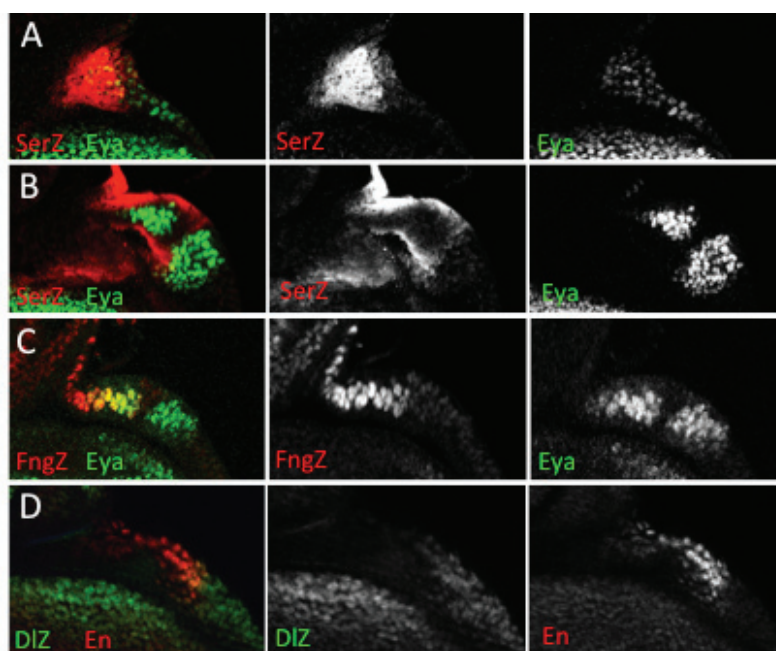


Figura D.1. Patrón de expresión de los ligandos de la vía de Notch Ser y DI y el modificador de la vía Fng

(A, D) Región dorsal de discos de tercer estadio temprano (A) o tardío (B-D) mostrando la expresión localizada en el dominio anterior de Ser (rojo) (A, B) y Fng (rojo) (C) y la expresión restringida de DI (verde) (D) en el dominio posterior. La expresión de Eya (verde) (A-C) y En (rojo) (D) marcan los primordios de los ocelos y la RIO, respectivamente.

# Conclusiones







**1.-** La RRG que controla la especificación y la distribución espacial de las células del complejo ocelar (CO) lo hace concatenando una serie de bucles de retro-alimentación positivos ([*otd*; *en*; *eya:so*]) que establecen identidad y aportan estabilidad a la expresión génica y de bucles represores ([*otd-wg*; *en-Hh*; *Optix-en*; y probablemente *mirr-en*) responsables de la distribución espacial de esas identidades (i.e. *patterning*).

**2.-** La transcripción de *hh*, cuya vía es necesaria para controlar la identidad, tamaño y distribución de las células del CO, es dinámica durante el desarrollo del mismo. Inicialmente, la transcripción de *hh* es generalizada en el primordio del CO y es responsable de la activación del *enhancer* auto-regulador de *otd* (*oc7*) y de los elevados niveles de *Otd*, los cuales son necesarios para la formación de todas las estructuras del CO. En estadios posteriores la expresión de *hh* queda restringida a las células centrales. La expresión tardía de *en* en estas células centrales juega un papel decisivo en la transición de este patrón.

**3.-** La vía de *hh* es responsable de la generación de dos destinos celulares: ojo y cutícula interocelar mediante la activación de, al menos, dos genes esenciales, *eya* (y *so*) y *en*, en dominios complementarios. La complementariedad en la expresión de estos genes es posible gracias a dos mecanismos: uno temporal, en el que la expresión de *eya* precede a la de *en*, y otro, por el que la expresión de *en* está limitada espacialmente.

**4.-** La expresión localizada de *en* en la futura RIO permite la definición de los dominios competentes para la formación de los ocelos mediante la represión transcripcional de *ci* y *ptc*, componentes de la vía de Hh y reguladores positivos de la actividad de *eya* (y *so*). La expresión de *en*, una vez reprimido su activador inicial, *ci*, se auto-mantiene gracias a la acción de la vía de Notch a través de su ligando Dl.

**5.-** El gen *Six3/Optix*, expresado en el dominio anterior del CO, es requerido para el desarrollo del ocelo anterior reprimiendo la expresión de *en*, quien actúa como regulador negativo del destino ocelar. Este mecanismo



anti-represor permite el establecimiento del borde que separa la población precursora del ocelo de la población precursora de la RIO.

**6.-** El gen del complejo Iroquois, *mirr*, cuya expresión en el disco de ojo, en estadios L3 tardíos, está restringida a la cabeza dorsal, es necesario para el desarrollo específico de los ocelos, a través de un mecanismo que incluye la fijación de los límites del dominio de expresión de *en*.



# Agradecimientos







Bueno y no podía terminar esta tesis sin antes agradecer a todas aquellas personas que de una manera u otra han contribuido a que hoy me encuentre aquí escribiendo estas palabras. Han sido cinco largos años que si ahora llegan a su fin es, sin duda alguna, gracias a vuestra ayuda.

En primer lugar quiero agradecerte a ti, Fernando, por haberme dado esta oportunidad y haber confiado en mí y en mi criterio científico durante todos estos años. No ha sido fácil, eso seguro, pero tu disponibilidad en todo momento y tu ayuda incondicional han hecho este viaje mucho más llevadero. De ti me llevo el entusiasmo por la ciencia y por el trabajo bien hecho.

Por supuesto un gracias en mayúsculas para Carla. Porque a ti te debo gran parte de lo aprendido en esta aventura, y no solo en lo relativo al labo, tus charlas y consejos han sido imprescindibles para no tirar la toalla y seguir con esto hasta el final, dura tarea la tuya... Tarea compartida en muchos momentos con el resto del labo, por eso, también quiero agradecerlos a todos los que habéis formado parte de él, el haber dejado un poquito de vosotros en mí. Gracias a Marta, Anto, Lola, Carlos, Asun, Cris, Ana Sara y Annette. Gracias también a las nuevas incorporaciones Diana y Magri. Y un gracias muy especial a Jorge, porque además de compañero has sido y eres un gran amigo.

Agradeceros también a vosotras, Inês y María por vuestra amistad y por haber formado parte de esta tesis; gracias por esas charlas de despacho que han sido imprescindibles, compartiendo penas pero también muchas alegrías; gracias por las comidas, las salidas y en definitiva gracias por ser como sois. Gracias también a ti Manolillo, y a esos cafés de después de comer arreglando el mundo. A Mario y las charlitas compartidas en la flyroom, sin duda han hecho más amenas las largas horas que allí hemos pasado. A David por tus “grandes” chistes, y por tener siempre una sonrisa para todos y ante todo. Y gracias a todas esas personas del CABD que han puesto su granito de arena en esta historia llenándola de buenos momentos, gracias a Mer, Calero, Miriam, Jose, Sofía, Helena, Elena, los Damianes, Ozren, Rocío, Joaquín y Kathy.

Y porque no todo queda en el CABD, un enorme gracias a las niñas de Mairena. Porque llevamos compartiendo aventuras desde el colegio y como no podía ser menos, viniendo de vosotras, habéis sido imprescindibles durante estos últimos años. Gracias por vuestra amistad y aguantarme como lo habéis hecho. Gracias a ti Picón por saber escucharme y



aconsejarme siempre con una sonrisa; a Carmen por demostrarme que la distancia no puede con la amistad; a Berta y a Nini por seguir ahí a pesar de todo; a Susana por aportar siempre ese toque de glamour; a María y a Paloma por hacer de cada anécdota una divertida historia; a Arrate por compartir conmigo la ardua tarea de poner el punto discordante; a Clara por llenar nuestros momentos de creatividad; y gracias también a Mercedes, Cris, Cristy, Noemí, Sara y Ari por todas las aventuras compartidas y las que sin duda todavía nos quedan por compartir.

Gracias también a mis dos catalanas favoritas; Irene, por haber estado siempre ahí compartiendo conmigo cada momento de la carrera, por haberme transmitido tu entusiasmo, tu alegría y tu espíritu luchador y porque mi paso por Vic no hubiese sido lo mismo sin ti. Y Silvia por tu paciencia, por tu saber estar, por aportar ese punto de calma en el piso, por tener siempre una sonrisa y esas eternas ganas *de fer unes birretas* que tan buenos momentos nos han dado.

Y por último, pero sin duda el más importante, GRACIAS a mi familia. Gracias a mi madre y a mis hermanas por apoyarme ante cualquier decisión por loca que parezca; gracias por animarme a seguir siempre hacia delante y; gracias porque sin vuestra incansable ayuda probablemente hoy no estaría aquí sentada escribiendo las últimas palabras de la tesis. Gracias también a ti Jorge por tu ayuda, especialmente en esta fase final.

En definitiva a todos vosotros: MUCHISIMAS GRACIAS!!

# Referencias





Acampora, D., Avantaggiato, V., Tuorto, F., Barone, P., Reichert, H., Finkelstein, R., and Simeone, A. (1998). Murine *Otx1* and *Drosophila otd* genes share conserved genetic functions required in invertebrate and vertebrate brain development. *Development* 125, 1691-1702.

Aguilar-Hidalgo, D., Domínguez-Cejudo, M. A., Amore, G., Brockmann, A., Lemos, M. C., Córdoba, A., and Casares, F. (2013). A Hh-driven gene network controls specification, pattern and size of the *Drosophila* simple eyes. *Development* 140, 82-92.

Alexandre, C., Baena-Lopez, A., and Vincent, J. (2014). Patterning and growth control by membrane-tethered Wingless. *Nature* 505, 180-185.

Alexandre, C., Jacinto, A., and Ingham, P. W. (1996). Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes Dev.* 10, 2003-2013.

Amin, A. (2004). Genetic Cross-Talk During Head Development in *Drosophila*. *J. Biomed. Biotechnol.* 2004, 16-23.

Amin, A., Li, Y., and Finkelstein, R. (1999). Hedgehog activates the EGF receptor pathway during *Drosophila* head development. *Development* 126, 2623-2630.

Anderson, A. M., Weasner, B. M., Weasner, B. P., and Kumar, J. P. (2012). Dual transcriptional activities of SIX proteins define their roles in normal and ectopic eye development. *Development* 139, 991-1000.

Averof, M., and Patel, N. H. (1997). Crustacean appendage evolution associated with changes in Hox gene expression. *Nature* 388, 682-686.

Aza-Blanc, P., Ramírez-Weber, F. A., Laget, M. P., Schwartz, C., and Kornberg, T. B. (1997). Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* 89, 1043-1053.

Azpiaz, N., and Morata, G. (2000). Function and regulation of homothorax in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Development* 127, 2685-2693.

Bachmann, A., and Knust, E. (1998). Dissection of cis-regulatory elements of the *Drosophila* gene *Serrate*. *Dev. Genes Evol.* 208, 346-351.

Baker, W. K. (1978). A clonal analysis reveals early developmental restrictions in





the *Drosophila* head. *Dev. Biol.* 62, 447-463.

Baonza, A., and Freeman, M. (2002). Control of *Drosophila* eye specification by Wingless signalling. *Development* 129, 5313-5322.

Bessa, J., Gebelein, B., Pichaud, F., Casares, F., and Mann, R. S. (2002). Combinatorial control of *Drosophila* eye development by *eyeless*, *homothorax*, and *teashirt*. *Genes Dev.* 16, 2415-2427.

Bessa, J., and Casares, F. (2005). Restricted *teashirt* expression confers eye-specific responsiveness to Dpp and Wg signals during eye specification in *Drosophila*. *Development* 132, 5011-5020.

Biehs, B., Kechris, K., Liu, S., and Kornberg, T. B. (2010). Hedgehog targets in the *Drosophila* embryo and the mechanisms that generate tissue-specific outputs of Hedgehog signaling. *Development* 137, 3887-3898.

Blair, S. S. (2001). Cell lineage: compartments and Capricious. *Curr. Biol.* 11, R1017-21.

Blair, S. S. (1995). Compartments and appendage development in *Drosophila*. *Bioessays* 17, 299-309.

Blair, S. S. (1992). Engrailed expression in the anterior lineage compartment of the developing wing blade of *Drosophila*. *Development* 115, 21-33.

Blanco, J., Pauli, T., Seimiya, M., Udolph, G., and Gehring, W. J. (2010). Genetic interactions of *eyes absent*, *twin of eyeless* and *orthodenticle* regulate *sine oculis* expression during ocellar development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 344, 1088-1099.

Blanco, J., Seimiya, M., Pauli, T., Reichert, H., and Gehring, W. J. (2009). Wingless and Hedgehog signaling pathways regulate *orthodenticle* and *eyes absent* during ocelli development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 329, 104-115.

Bovolenta, P., Mallamaci, A., Puelles, L., and Boncinelli, E. (1998). Expression pattern of *cSix3*, a member of the *Six/sine oculis* family of transcription factors. *Mech. Dev.* 70, 201-203.

Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.

Briscoe, J., Chen, Y., Jessell, T. M., and Struhl, G. (2001). A hedgehog-insensiti-

ve form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol. Cell* 7, 1279-1291.

Brockmann, A., Domínguez-Cejudo, M. A., Amore, G., and Casares, F. (2011). Regulation of ocellar specification and size by twin of eyeless and homothorax. *Dev. Dyn.* 240, 75-85.

Buszczak, M., Paterno, S., Lighthouse, D., Bachman, J., Planck, J., Owen, S., Skora, A. D., Nystul, T. G., Ohlstein, B., Allen, A., et al. (2007). The carnegie protein trap library: a versatile tool for *Drosophila* developmental studies. *Genetics* 175, 1505-1531.

Cadigan, K. M., and Nusse, R. (1996). wingless signaling in the *Drosophila* eye and embryonic epidermis. *Development* 122, 2801-2812.

Campos-Ortega, J. A., and Hartenstein, V. (1997). *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster* 2nd ed. (Springer).

Capdevila, J., Estrada, M. P., Sánchez-Herrero, E., and Guerrero, I. (1994). The *Drosophila* segment polarity gene patched interacts with decapentaplegic in wing development. *EMBO J.* 13, 71-82.

Casali, A., and Struhl, G. (2004). Reading the Hedgehog morphogen gradient by measuring the ratio of bound to unbound Patched protein. *Nature* 431, 76-80.

Casares, F., and Mann, R. S. (2000). A dual role for homothorax in inhibiting wing blade development and specifying proximal wing identities in *Drosophila*. *Development* 127, 1499-1508.

Casares, F., and Mann, R. S. (1998). Control of antennal versus leg development in *Drosophila*. *Nature* 392, 723-726.

Cavodeassi, F., Díez del Corral, R., Campuzano, S., and Domínguez, M. (1999). Compartments and organising boundaries in the *Drosophila* eye: the role of the homeodomain Iroquois proteins. *Development* 126, 4933-4942.

Cavodeassi, F., Rodríguez, I., and Modolell, J. (2002). Dpp signalling is a key effector of the wing-body wall subdivision of the *Drosophila* mesothorax. *Development* 129, 3815-3823.

Chao, J., Tsai, Y., Chiu, S., and Sun, Y. H. (2004). Localized Notch signal acts through eyg and upd to promote global growth in *Drosophila* eye. *Development*



131, 3839-38-47.

Chen, R., Halder, G., Zhang, Z., and Mardon, G. (1999). Signaling by the TGF-beta homolog decapentaplegic functions reiteratively within the network of genes controlling retinal cell fate determination in *Drosophila*. *Development* 126, 935-943.

Cheyette, B. N., Green, P. J., Martin, K., Garren, H., Hartenstein, V., and Zipursky, S. L. (1994a). The *Drosophila* sine oculis locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron* 12, 977-996.

Cheyette, B. N., Green, P. J., Martin, K., Garren, H., Hartenstein, V., and Zipursky, S. L. (1994b). The *Drosophila* sine oculis locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron* 12, 977-996.

Cho, K. O., Chern, J., Izaddoost, S., and Choi, K. W. (2000). Novel signaling from the peripodial membrane is essential for eye disc patterning in *Drosophila*. *Cell* 103, 331-342.

Cho, K. O., and Choi, K. W. (1998). Fringe is essential for mirror symmetry and morphogenesis in the *Drosophila* eye. *Nature* 396, 272-276.

Cohen, M., Briscoe, J., and Blassberg, R. (2013). Morphogen interpretation: the transcriptional logic of neural tube patterning. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 23, 423-428.

Coiffier, D., Charroux, B., and Kerridge, S. (2008). Common functions of central and posterior Hox genes for the repression of head in the trunk of *Drosophila*. *Development* 135, 291-300.

Curtiss, J., and Mlodzik, M. (2000). Morphogenetic furrow initiation and progression during eye development in *Drosophila*: the roles of decapentaplegic, hedgehog and eyes absent. *Development* 127, 1325-1336.

Czerny, T., Halder, G., Kloter, U., Souabni, A., Gehring, W. J., and Busslinger, M. (1999). twin of eyeless, a second Pax-6 gene of *Drosophila*, acts upstream of eyeless in the control of eye development. *Mol. Cell* 3, 297-307.

Darwin, C. (2010). *The Origin of Species* (Cricket House Books LLC).

Dassow, von, G., Meir, E., Munro, E. M., and Odell, G. M. (2000). The segment polarity network is a robust developmental module. *Nature* 406, 188-192.

Datar, S. A., Jacobs, H. W., la Cruz, de, A. F., Lehner, C. F., and Edgar, B. A. (2000). The *Drosophila* cyclin D-Cdk4 complex promotes cellular growth. *EMBO J.* 19, 4543-4554.

Davidson, E. H. (2001). *Genomic Regulatory Systems* (Academic Press).

Davidson, E. H., McClay, D. R., and Hood, L. (2003). Regulatory gene networks and the properties of the developmental process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 1475-1480.

Davidson, E. H., and Erwin, D. H. (2006). Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. *Science* 311, 796-800.

Davis, I., Girdham, C. H., and O'Farrell, P. H. (1995). A nuclear GFP that marks nuclei in living *Drosophila* embryos; maternal supply overcomes a delay in the appearance of zygotic fluorescence. *Dev. Biol.* 170, 726-729.

De Navascués J. and Modolell J. (2007). *tailup*, a LIM-HD gene, and Iro-C cooperate in *Drosophila* dorsal mesothorax specification. *Development* 134, 1779-1788.

de Wetering, van, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loreiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A., et al. (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* 88, 789-799.

Domínguez, M. (1999). Dual role for Hedgehog in the regulation of the proneural gene *atonal* during ommatidia development. *Development* 126, 2345-2353.

Domínguez, M., Ferres-Marco, D., Gutierrez-Aviño, F. J., Speicher, S. A., and Beneyto, M. (2004). Growth and specification of the eye are controlled independently by *Eye gone* and *Eyeless* in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* 36, 31-39.

Domínguez, M., Brunner, M., Hafen, E., and Basler, K. (1996). Sending and receiving the hedgehog signal: control by the *Drosophila* Gli protein *Cubitus interruptus*. *Science* 272, 1621-1625.

Domínguez, M., and Casares, F. (2005). Organ specification-growth control con-



nection: new in-sights from the *Drosophila* eye-antennal disc. *Dev. Dyn.* 232, 673-684.

Domínguez, M., and de Celis, J. F. (1998). A dorsal/ventral boundary established by Notch controls growth and polarity in the *Drosophila* eye. *Nature* 396, 276-278.

Domínguez, M., and Hafen, E. (1997). Hedgehog directly controls initiation and propagation of retinal differentiation in the *Drosophila* eye. *Genes Dev.* 11, 3254-3264.

Dong, P. D., Chu, J., and Panganiban, G. (2001). Proximodistal domain specification and interactions in developing *Drosophila* appendages. *Development* 128, 2365-2372.

Eaton, S. A. K. T. B. (1990). Repression of *ci-D* in posterior compartments of *Drosophila* by engrailed. *Genes Dev.* 4, 1068-1077.

Ekas, L. A., Baeg, G., Flaherty, M. S., Ayala-Camargo, A., and Bach, E. A. (2006). JAK/STAT signaling promotes regional specification by negatively regulating wingless expression in *Drosophila*. *Development* 133, 4721-4729.

Evans, C. J., Olson, J. M., Ngo, K. T., Kim, E., Lee, N. E., Kuoy, E., Patananan, A. N., Sitz, D., Tran, P., Do, M., et al. (2009). G-TRACE: rapid Gal4-based cell lineage analysis in *Drosophila*. *Nature Methods* 6, 603-605.

Fehon, R. G., Kooh, P. J., Rebay, I., Regan, C. L., Xu, T., Muskavitch, M. A., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* 61, 523-534.

Felsenfeld, A. L., and Kennison, J. A. (1995). Positional signaling by hedgehog in *Drosophila* imaginal disc development. *Development* 121, 1-10.

Finkelstein, R., Smouse, D., Capaci, T. M., Spradling, A. C., and Perrimon, N. (1990). The orthodenticle gene encodes a novel homeo domain protein involved in the development of the *Drosophila* nervous system and ocellar visual structures. *Genes Dev.* 4, 1516-1527.

Fleming, R. J., Scottgale, T. N., Diederich, R. J., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). The gene *Serrate* encodes a putative EGF-like transmembrane protein essential for proper ectodermal development in *Drosophila melanogaster*. *Ge-*

nes Dev. 4, 2188-2201.

Forbes, A. J., Nakano, Y., Taylor, A. M., and Ingham, P. W. (1993). Genetic analysis of hedgehog signalling in the *Drosophila* embryo. Dev. Suppl., 115-124.

Fortini, M. E., and Artavanis-Tsakonas, S. (1994). The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. Cell 79, 273-282.

Freeman, M. (1996). Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. Cell 87, 651-660.

Friedrich, M. (2006). Ancient mechanisms of visual sense organ development based on comparison of the gene networks controlling larval eye, ocellus, and compound eye specification in *Drosophila*. Arthropod Struct Dev 35, 357-378.

Fristom, D., and Fristom, J. W. (1975). The mechanism of evagination of imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. 1. General considerations. Dev. Biol. 43, 1-23.

Gehring, W. J. (2004). Historical perspective on the development and evolution of eyes and photoreceptors. Int. J. Dev. Biol. 48, 707-717.

Gehring, W. J. (2002). The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types. Int. J. Dev. Biol. 46, 65-73.

Gehring, W. J., and Ikeo, K. (1999). Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. Trends Genet. 15, 371-377.

Gehring, W., and Seimiya, M. (2010). Eye evolution and the origin of Darwin's eye prototype. Italian Journal of Zoology 77, 124-136.

Giorgianni, M. W., and Patel, N. H. (2004). Patterning of the branched head appendages in *Schistocerca americana* and *Tribolium castaneum*. Evol. Dev. 6, 402-410.

Golic, K. G., and Lindquist, S. (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. Cell 59, 499-509.

Gomez-Skarmeta, J. L., Diez del Corral, R., la Calle-Mustienes, de, E., Ferré-Marcó, D., and Modolell, J. (1996). Araucan and caupolican, two members of the novel iroquois complex, encode homeoproteins that control proneural and vein-forming genes. Cell 85, 95-105.

Grammont, M., and Irvine, K. D. (2001). fringe and Notch specify polar cell fate



during *Drosophila* oogenesis. *Development* 128, 2243-2253.

Guerrero, I., and Kornberg, T. B. (2014). Hedgehog and its circuitous journey from producing to target cells. *Semin. Cell Dev. Biol.*

Guillén, I., Mullor, J. L., Capdevila, J., Sánchez-Herrero, E., Morata, G., and Guerrero, I. (1995). The function of engrailed and the specification of *Drosophila* wing pattern. *Development* 121, 3447-3456.

Gutierrez-Aviño, F. J., Ferres-Marco, D., and Domínguez, M. (2009). The position and function of the Notch-mediated eye growth organizer: the roles of JAK/STAT and four-jointed. *EMBO Rep.* 10, 1051-1058.

Haenlin, M., Kunisch, M., Kramatschek, B., and Campos-Ortega, J. A. (1994). Genomic regions regulating early embryonic expression of the *Drosophila* neurogenic gene Delta. *Mech. Dev.* 47, 99-110.

Hayashi, S., Ito, K., Sado, Y., Taniguchi, M., Akimoto, A., Takeuchi, H., Aigaki, T., Matsuzaki, F., Nakagoshi, H., Tanimura, T., et al. (2002). GETDB, a database compiling expression patterns and molecular locations of a collection of Gal4 enhancer traps. *Genesis* 34, 58-61.

Hazelett, D. J., Bourouis, M., Walldorf, U., and Treisman, J. E. (1998). decapentaplegic and wingless are regulated by eyes absent and eyegone and interact to direct the pattern of retinal differentiation in the eye disc. *Development* 125, 3741-3751.

Heanue, T. A., Reshef, R., Davis, R. J., Mardon, G., Oliver, G., Tomarev, S., Lassar, A. B., and Tabin, C. J. (1999). Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for *Drosophila* eye formation. *Genes Dev.* 13, 3231-3243.

Heberlein, U., Wolff, T., and Rubin, G. M. (1993). The TGF beta homolog dpp and the segment polarity gene hedgehog are required for propagation of a morphogenetic wave in the *Drosophila* retina. *Cell* 75, 913-926.

Heberlein, U., Borod, E. R. and Chanut F. A. (1998). Dorsoventral patterning in the *Drosophila* retina by wingless. *Development* 125, 567-577.

Heemskerk, J., DiNardo, S., Kostriken, R., and O'Farrell, P. H. (1991). Multiple modes of engrailed regulation in the progression towards cell fate determination. *Nature* 352, 404-410.



- Hepker, J., Wang, Q. T., Motzny, C. K., Holmgren, R., and Orenic, T. V. (1997). *Drosophila cubitus interruptus* forms a negative feedback loop with patched and regulates expression of Hedgehog target genes. *Development* 124, 549-558.
- Hidalgo, A., and Ingham, P. (1990). Cell patterning in the *Drosophila* segment: spatial regulation of the segment polarity gene patched. *Development* 110, 291-301.
- Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., and Pan, D. (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* 122, 421-434.
- Irvine, K. D., and Vogt, T. F. (1997). Dorsal—ventral signaling in limb development. *Current Opinion in Cell Biology* 9, 867-876.
- Jaynes, J. B., and O'Farrell, P. H. (1991). Active repression of transcription by the engrailed homeodomain protein. *EMBO J.* 10, 1427-1433.
- Jockusch, E. L., Williams, T. A., and Nagy, L. M. (2004). The evolution of patterning of serially homologous appendages in insects. *Dev. Genes Evol.* 214, 324-338.
- Johnston, R. J., Otake, Y., Sood, P., Vogt, N., Behnia, R., Vasiliauskas, D., McDonald, E., Xie, B., Koenig, S., Wolf, R., et al. (2011). Interlocked feedforward loops control cell-type-specific Rhodopsin expression in the *Drosophila* eye. *Cell* 145, 956-968.
- Jory, A., Estella, C., Giorgianni, M. W., Slattery, M., Lavery, T. R., Rubin, G. M., and Mann, R. S. (2012). A survey of 6,300 genomic fragments for cis-regulatory activity in the imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Cell Rep* 2, 1014-1024.
- Jürgens, G., Lehmann, R., Schardin, M., and Niisslein-Volhard, C. (1986). Segmental organisation of the head in the embryo of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch Dev Biol* 195, 359-377.
- Karsten, P., Plischke, I., Perrimon, N., and Zeidler, M. P. (2006). Mutational analysis reveals separable DNA binding and trans-activation of *Drosophila* STAT92E. *Cell. Signal.* 18, 819-829.
- Kassis, J. A., Noll, E., VanSickle, E. P., Odenwald, W. F., and Perrimon, N. (1992). Altering the insertional specificity of a *Drosophila* transposable element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1919-1923.



- Kenyon, K. L., Ranade, S. S., Curtiss, J., Mlodzik, M., and Pignoni, F. (2003). Coordinating proliferation and tissue specification to promote regional identity in the *Drosophila* head. *Dev. Cell* 5, 403-414.
- Kenyon, K. L., Li, D. J., Clouser, C., Tran, S., and Pignoni, F. (2005). Fly SIX-type homeodomain proteins *Sine oculis* and *Optix* partner with different cofactors during eye development. *Dev. Dyn.* 234, 497-504.
- Kiritooshi, N., Yorimitsu, T., Shirai, T., Puli, O. R., Singh, A., and Nakagoshi, H. (2014). A vertex specific dorsal selector *Dve* represses the ventral appendage identity in *Drosophila* head. *Mech. Dev.*
- Knoblich, J. A., Sauer, K., Jones, L., Richardson, H., Saint, R., and Lehner, C. F. (1994). Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* 77, 107-120.
- Kobayashi, M., Fujioka, M., Tolkunova, E. N., Deka, D., Abu-Shaar, M., Mann, R. S., and Jaynes, J. B. (2003). *Engrailed* cooperates with *extradenticle* and *homothorax* to repress target genes in *Drosophila*. 130, 741-751.
- Kumar, J. P., and Moses, K. (2001). EGF receptor and Notch signaling act upstream of *Eyeless/Pax6* to control eye specification. *Cell* 104, 687-697.
- Kwon, D., Mucci, D., Langlais, K. K., Americo, J. L., DeVido, S. K., Cheng, Y., and Kassis, J. A. (2009). Enhancer-promoter communication at the *Drosophila* *engrailed* locus. *Development* 136, 3067-3075.
- Lagutin, O., Zhu, C. C., Furuta, Y., Rowitch, D. H., McMahon, A. P., and Oliver, G. (2001). *Six3* promotes the formation of ectopic optic vesicle-like structures in mouse embryos. *Dev. Dyn.* 221, 342-349.
- Lagutin, O. V., Zhu, C. C., Kobayashi, D., Topczewski, J., Shimamura, K., Puebles, L., Russell, H. R. C., McKinnon, P. J., Solnica-Krezel, L., and Oliver, G. (2003). *Six3* repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes Dev.* 17, 368-379.
- Lane, M. E., Sauer, K., Wallace, K., Jan, Y. N., Lehner, C. F., and Vaessin, H. (1996). *Dacapo*, a cyclin-dependent kinase inhibitor, stops cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell* 87, 1225-1235.
- Lee, J. J., Kessler, von, D. P., Parks, S., and Beachy, P. A. (1992). Secretion and

localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene *hedgehog*. *Cell* 71, 33-50.

Lengler, J., and Graw, J. (2001). Regulation of the human SIX3 gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 372-376.

Letizia A., Barrio R., Campuzano S. (2007). Antagonistic and cooperative actions of the EGFR and Dpp pathways on the *iroquois* genes regulate *Drosophila* mesothorax specification and patterning. *Development* 134, 1337-1346.

Levine, M., and Davidson, E. H. (2005). Gene regulatory networks for development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 4936-4942.

Li, X., Cassidy, J. J., Reinke, C. A., Fischboeck, S., and Carthew, R. W. (2009). A MicroRNA Imparts Robustness against Environmental Fluctuation during Development. *Cell* 137, 273-282.

Li, X., Oghi, K. A., Zhang, J., Krones, A., Bush, K. T., Glass, C. K., Nigam, S. K., Aggarwal, A. K., Maas, R., Rose, D. W., et al. (2003). Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature* 426, 247-254.

Li, Y., Jiang, Y., Chen, Y., Karandikar, U., Hoffman, K., Chattopadhyay, A., Mardon, G., and Chen, R. (2013). optix functions as a link between the retinal determination network and the dpp pathway to control morphogenetic furrow progression in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 381, 50-61.

Loosli, F., Winkler, S., and Wittbrodt, J. (1999). Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina. *Genes Dev.* 13, 649-654.

Loosli, F., Köster, R. W., Carl, M., Krone, A., and Wittbrodt, J. (1998). Six3, a *me-daka* homologue of the *Drosophila* homeobox gene *sine oculis* is expressed in the anterior embryonic shield and the developing eye. *Mech. Dev.* 74, 159-164.

Lopes, C. S., and Casares, F. (2010). hth maintains the pool of eye progenitors and its downregulation by Dpp and Hh couples retinal fate acquisition with cell cycle exit. *Dev. Biol.* 339, 78-88.

Lowe, C. J., Wu, M., Salic, A., Evans, L., Lander, E., Stange-Thomann, N., Gruber, C. E., Gerhart, J., and Kirschner, M. (2003). Anteroposterior patterning in hemichordates and the origins of the chordate nervous system. *Cell* 113, 853-865.



- López-Ríos, J., Tessmar, K., Loosli, F., Wittbrodt, J., and Bovolenta, P. (2003). Six3 and Six6 activity is modulated by members of the groucho family. *Development* 130, 185-195.
- Luo, H., Asha, H., Kockel, L., Parke, T., Mlodzik, M., and Dearolf, C. R. (1999). The *Drosophila* Jak kinase hopscotch is required for multiple developmental processes in the eye. *Dev. Biol.* 213, 432-441.
- Ma, C., and Moses, K. (1995). Wingless and patched are negative regulators of the morphogenetic furrow and can affect tissue polarity in the developing *Drosophila* compound eye. *Development* 121, 2279-2289.
- Macrae, I. J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A. N., Cande, W. Z., Adams, P. D., and Doudna, J. A. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311, 195-198.
- Mann, R. S., and Carroll, S. B. (2002). Molecular mechanisms of selector gene function and evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 592-600.
- Mann, R. S., and Morata, G. (2000). THE DEVELOPMENTAL AND MOLECULAR BIOLOGY OF GENES THAT SUBDIVIDE THE BODY OF *DROSOPHILA*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 243-271.
- Mardon, G., Solomon, N. M., and Rubin, G. M. dachshund encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*.
- Martinez-Morales, J. R., Signore, M., Acampora, D., Simeone, A., and Bovolenta, P. (2001). Otx genes are required for tissue specification in the developing eye. *Development* 128, 2019-2030.
- Maurel-Zaffran, C., and Treisman, J. E. (2000). pannier acts upstream of wingless to direct dorsal eye disc development in *Drosophila*. *Development* 127, 1007-1016.
- McNeill, H., Yang, C. H., Brodsky, M., Ungos, J., and Simon, M. A. (1997). mirror encodes a novel PBX-class homeoprotein that functions in the definition of the dorsal-ventral border in the *Drosophila* eye. *Genes Dev.* 11, 1073-1082.
- Méthot, N., and Basler, K. (1999). Hedgehog Controls Limb Development by Regulating the Activities of Distinct Transcriptional Activator and Repressor Forms of Cubitus interruptus

. Cell 96, 819-831.

Mohler, J., and Vani, K. (1992). Molecular organization and embryonic expression of the hedgehog gene involved in cell-cell communication in segmental patterning of *Drosophila*. *Development* 115, 957-971.

Morata, G., and Lawrence, P. A. (1978). Anterior and posterior compartments in the head of *Drosophila*. *Nature* 274, 473-474.

Morin, X., Daneman, R., Zavortink, M., and Chia, W. (2001). A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 15050-15055.

Mukherjee, T., Hombría, J. C., and Zeidler, M. P. (2005). Opposing roles for *Drosophila* JAK/STAT signalling during cellular proliferation. *Oncogene* 24, 2503-2511.

Nahmad, M., and Stathopoulos, A. (2009). Dynamic interpretation of hedgehog signaling in the *Drosophila* wing disc. *PLoS Biol.* 7, e1000202.

Nakagawa, Y., Fujiwara-Fukuta, S., Yorimitsu, T., Tanaka, S., Minami, R., Shimo-oka, L., and Nakagoshi, H. (2011). Spatial and temporal requirement of defective proventriculus activity during *Drosophila* midgut development. *Mech. Dev.* 128, 258-267.

Nakagoshi, H. (2005). Functional specification in the *Drosophila* endoderm. *Dev. Growth Differ.* 47, 383-392.

Nakagoshi, H., Hoshi, M., Nabeshima, Y., and Matsuzaki, F. (1998). A novel homeobox gene mediates the Dpp signal to establish functional specificity within target cells. *Genes Dev.* 12, 2724-2734.

Nakagoshi, H., Shirai, T., Nabeshima, Y., and Matsuzaki, F. (2002). Refinement of wingless expression by a wingless- and notch-responsive homeodomain protein, defective proventriculus. *Dev. Biol.* 249, 44-56.

Nellen, D., Burke, R., Struhl, G., and Basler, K. (1996). Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* 85, 357-368.

Netter, S., Fauvarque, M. O., Diez del Corral, R., Dura, J. M., and Coen, D. (1998). *white+* transgene insertions presenting a dorsal/ventral pattern define a single cluster of homeobox genes that is silenced by the polycomb-group pro-



teins in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 149, 257-275.

Ni, J., Markstein, M., Binari, R., Pfeiffer, B., Liu, L., Villalta, C., Booker, M., Perkins, L., and Perrimon, N. (2008). Vector and parameters for targeted transgenic RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Nature Methods* 5, 49-51.

O'Kane, C. J., and Gehring, W. J. (1987). Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 9123-9127.

Ohlmeyer, J. T., and Kalderon, D. (1998). Hedgehog stimulates maturation of *Cubitus interruptus* into a labile transcriptional activator. *Nature* 396, 749-753.

Ohto, H., Kamada, S., Tago, K., Tominaga, S. I., Ozaki, H., Sato, S., and Kawakami, K. (1999). Cooperation of six and *eya* in activation of their target genes through nuclear translocation of *Eya*. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6815-6824.

Ostrin, E. J., Li, Y., Hoffman, K., Liu, J., Wang, K., Zhang, L., Mardon, G., and Chen, R. (2006). Genome-wide identification of direct targets of the *Drosophila* retinal determination protein *Eyeless*. *Genome Res.* 16, 466-476.

Pai, C. Y., Kuo, T. S., Jaw, T. J., Kuran, E., Chen, C. T., Bessarab, D. A., Salzberg, A., and Sun, Y. H. (1998). The *Homothorax* homeoprotein activates the nuclear localization of another homeoprotein, *extradenticle*, and suppresses eye development in *Drosophila*. *Genes Dev.* 12, 435-446.

Pai, L. M., Orsulic, S., Bejsovec, A., and Peifer, M. (1997). Negative regulation of *Armadillo*, a *Wingless* effector in *Drosophila*. *Development* 124, 2255-2266.

Papayannopoulos, V., Tomlinson, A., Panin, V. M., Rauskolb, C., and Irvine, K. D. (1998). Dorsal-ventral signaling in the *Drosophila* eye. *Science* 281, 2031-2034.

Pastor-Pareja, J. C., Grawe, F., Martín-Blanco, E., and García-Bellido, A. (2004). Invasive cell behavior during *Drosophila* imaginal disc eversion is mediated by the JNK signaling cascade. *Dev. Cell* 7, 387-399.

Pauli, T., Seimiya, M., Blanco, J., and Gehring, W. J. (2005). Identification of functional *sine oculis* motifs in the autoregulatory element of its own gene, in the *eyeless* enhancer and in the signalling gene *hedgehog*. *Development* 132, 2771-2782.

Peifer, M., and Wieschaus, E. (1990). The segment polarity gene *armadillo* encodes a functionally modular protein that is the *Drosophila* homolog of human

plakoglobin. *Cell* 63, 1167-1176.

Pereira, P. S., Pinho, S., Johnson, K., Couso, J. P., and Casares, F. (2006). A 3' cis-regulatory region controls wingless expression in the *Drosophila* eye and leg primordia. *Developmental Dynamics* 235, 225-234.

Phelps, C. B., and Brand, A. H. (1998). UAS-Gal4 system. *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 14, 367-379.

Pichaud, F., Treisman, J., and Desplan, C. (2001). Reinventing a common strategy for patterning the eye. *Cell* 105, 9-12.

Pichaud, F., and Casares, F. (2000). *homothorax* and *iroquois-C* genes are required for the establishment of territories within the developing eye disc. *Mech. Dev.* 96, 15-25.

Pignoni, F., Hu, B., Zavitz, K. H., Xiao, J., Garrity, P. A., and Zipursky, S. L. (1997). The Eye-Specification Proteins *So* and *Eya* Form a Complex and Regulate Multiple Steps in *Drosophila* Eye Development

. *Cell* 91, 881-891. Available at: [Accessed December 26, 1997].

Posnien, N., Koniszewski, N. D. B., Hein, H. J., and Bucher, G. (2011). Candidate gene screen in the red flour beetle *Tribolium* reveals *six3* as ancient regulator of anterior median head and central complex development. *PLoS Genet.* 7, e1002416.

Punzo, C., Seimiya, M., Flister, S., Gehring, W. J., and Plaza, S. (2002). Differential interactions of *eyeless* and *twin of eyeless* with the *sine oculis* enhancer. *Development* 129, 625-634.

Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U., and Gehring, W. J. (1994). Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the *Small eye* gene in mice and *Aniridia* in humans. *Science* 265, 785-789.

Ranade, S. S., Yang-Zhou, D., Kong, S. W., McDonald, E. C., Cook, T. A., and Pignoni, F. (2008). Analysis of the *Otd*-dependent transcriptome supports the evolutionary conservation of *CRX/OTX/OTD* functions in flies and vertebrates. *Dev. Biol.* 315, 521-534.

Reynolds-Kenneally, J., and Mlodzik, M. (2005). Notch signaling controls proliferation through cell-autonomous and non-autonomous mechanisms in the *Droso-*





phila eye. *Dev. Biol.* 285, 38-48.

Rieckhof, G. E., Casares, F., Ryoo, H. D., Abu-Shaar, M., and Mann, R. S. (1997). Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell* 91, 171-183.

Rogers, K. W., and Schier, A. F. (2011). Morphogen gradients: from generation to interpretation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 377-407.

Royet, J., and Finkelstein, R. (1997). Establishing primordia in the *Drosophila* eye-antennal imaginal disc: the roles of decapentaplegic, wingless and hedgehog. *Development* 124, 4793-4800.

Royet, J., and Finkelstein, R. (1996). hedgehog, wingless and orthodenticle specify adult head development in *Drosophila*. *Development* 122, 1849-1858.

Royet, J., and Finkelstein, R. (1995). Pattern formation in *Drosophila* head development: the role of the orthodenticle homeobox gene. *Development* 121, 3561-3572.

Sanders, T. A., Llagostera, E., and Barna, M. (2013). Specialized filopodia direct long-range transport of SHH during vertebrate tissue patterning. *Nature* 497, 628-632.

Sanicola, M., Sekelsky, J., Elson, S., and Gelbart, W. M. (1995). Drawing a stripe in *Drosophila* imaginal disks: negative regulation of decapentaplegic and patched expression by engrailed. *Genetics* 139, 745-756.

Sanson, B., White, P., and Vincent, J. P. (1996). Uncoupling cadherin-based adhesion from wingless signalling in *Drosophila*. *Nature* 383, 627-630.

Schwartz, C., Locke, J., Nishida, C., and Kornberg, T. B. (1995). Analysis of cubitus interruptus regulation in *Drosophila* embryos and imaginal disks. *Development* 121, 1625-1635.

Seimiya, M., and Gehring, W. J. (2000). The *Drosophila* homeobox gene optix is capable of inducing ectopic eyes by an eyeless-independent mechanism. *Development* 127, 1879-1886.

Serikaku, M. A., and O'Tousa, J. E. (1994). sine oculis is a homeobox gene required for *Drosophila* visual system development. *Genetics* 138, 1137-1150.

Simeone, A., Acampora, D., Mallamaci, A., Stornaiuolo, A., D'Apice, M. R., Nigro,

V., and Boncinelli, E. (1993). A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J.* 12, 2735-2747.

Simmonds, A. J., Brook, W. J., Cohen, S. M., and Bell, J. B. (1995). Distinguishable functions for engrailed and Invected in anterior-posterior patterning in the *Drosophila* wing. 376, 424-427.

Smoller, D., Friedel, C., Schmid, A., Bettler, D., Lam, L., and Yedvobnick, B. (1990). The *Drosophila* neurogenic locus mastermind encodes a nuclear protein unusually rich in amino acid homopolymers. *Genes Dev.* 4, 1688-1700.

Staley, B. K., and Irvine, K. D. (2010). Warts and Yorkie mediate intestinal regeneration by influencing stem cell proliferation. *Curr. Biol.* 20, 1580-1587.

Steinmetz, P. R. H., Urbach, R., Posnien, N., Eriksson, J., Kostyuchenko, R. P., Brena, C., Guy, K., Akam, M., Bucher, G., and Arendt, D. (2010). Six3 demarcates the anterior-most developing brain region in bilaterian animals. *Evodevo* 1, 14.

Strigini, M., and Cohen, S. M. (1997). A Hedgehog activity gradient contributes to AP axial patterning of the *Drosophila* wing. *Development* 124, 4697-4705.

Struhl, G., and Basler, K. (1993). Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell* 72, 527-540.

Swarup, S., and Verheyen, E. M. (2012). Wnt/Wingless signaling in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.

Tabata, T., Schwartz, C., Gustavson, E., Ali, Z., and Kornberg, T. B. (1995). Creating a *Drosophila* wing de novo, the role of engrailed, and the compartment border hypothesis. *Development* 121, 3359-3369.

Tabata, T., Eaton, S., and Kornberg, T. B. (1992). The *Drosophila* hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation. *Genes Dev.* 6, 2635-2645.

Tabata, T., and Kornberg, T. B. (1994). Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 76, 89-102.

Tabata, T., and Takei, Y. (2004). Morphogens, their identification and regulation. *Development* 131, 703-712.



- Tanimoto, H., Itoh, S., Dijke, ten, P., and Tabata, T. (2000). Hedgehog creates a gradient of DPP activity in *Drosophila* wing imaginal discs. *Mol. Cell* 5, 59-71.
- Toy, J., Yang, J. M., Leppert, G. S., and Sundin, O. H. (1998). The *optx2* homeobox gene is expressed in early precursors of the eye and activates retina-specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 10643-10648.
- Treisman, J. E., and Heberlein, U. (1998). Eye development in *Drosophila*: formation of the eye field and control of differentiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 39, 119-158.
- Treisman, J. E., and Rubin, G. M. (1995). *wingless* inhibits morphogenetic furrow movement in the *Drosophila* eye disc. *Development* 121, 3519-3527.
- Tsai, Y., and Sun, Y. H. (2004). Long-range effect of *upd*, a ligand for Jak/STAT pathway, on cell cycle in *Drosophila* eye development. *Genesis* 39, 141-153.
- Wallis, D. E., Roessler, E., Hehr, U., Nanni, L., Wiltshire, T., Richieri-Costa, A., Gillissen-Kaesbach, G., Zackai, E. H., Rommens, J., and Muenke, M. (1999). Mutations in the homeodomain of the human *SIX3* gene cause holoprosencephaly. *Nat. Genet.* 22, 196-198.
- Wang, L., Huang, Y., Tsai, Y., and Sun, Y. H. (2010). The role of *eyg* Pax gene in the development of the head vertex in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 337, 246-258.
- Wargelius, A., Seo, H., Austbø, L., and Fjose, A. (2003). Retinal expression of zebrafish *six3.1* and its regulation by Pax6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309, 475-481.
- Weasner, B., Salzer, C., and Kumar, J. P. (2007). *Sine oculis*, a member of the SIX family of transcription factors, directs eye formation. *Dev. Biol.* 303, 756-771.
- Wei, Z., Yaguchi, J., Yaguchi, S., Angerer, R. C., and Angerer, L. M. (2009). The sea urchin animal pole domain is a Six3-dependent neurogenic patterning center. *Development* 136, 1179-1189.
- Whitten, J. M. (1963). THE FLY PTILINUM: TACTILE RECEPTORS AND THEIR FUNCTION AT EMERGENCE. *Journal of the Linnean Society of London, Zoology* 44, 725-730.
- Wieschaus, E., Perrimon, N., and Finkelstein, R. (1992). *orthodenticle* activity is required for the development of medial structures in the larval and adult epidermis of *Drosophila*. *Development* 115, 801-811.

- Willert, K., Logan, C. Y., Arora, A., Fish, M., and Nusse, R. (1999). A *Drosophila* Axin homolog, Daxin, inhibits Wnt signaling. *Development* 126, 4165-4173.
- Wolpert, L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J. Theor. Biol.* 25, 1-47.
- Xu, P. X., Zhang, X., Heaney, S., Yoon, A., Michelson, A. M., and Maas, R. L. (1999). Regulation of Pax6 expression is conserved between mice and flies. *Development* 126, 383-395.
- Xu, T., Rebay, I., Fleming, R. J., Scottgale, T. N., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). The Notch locus and the genetic circuitry involved in early *Drosophila* neurogenesis. *Genes Dev.* 4, 464-475.
- Xu, T., and Rubin, G. M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 117, 1223-1237.
- Yorimitsu, T., Kiritooshi, N., and Nakagoshi, H. (2011). Defective proventriculus specifies the ocellar region in the *Drosophila* head. *Dev. Biol.* 356, 598-607.
- Zecca, M., and Struhl, G. (2002). Subdivision of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* 129, 1357-1368.
- Zhu, C. C., Dyer, M. A., Uchikawa, M., Kondoh, H., Lagutin, O. V., and Oliver, G. (2002). Six3-mediated auto repression and eye development requires its interaction with members of the Groucho-related family of co-repressors. *Development* 129, 2835-2849.
- Zimmerman, J. E., Bui, Q. T., Liu, H., and Bonini, N. M. (2000). Molecular genetic analysis of *Drosophila* eyes absent mutants reveals an eye enhancer element. *Genetics* 154, 237-246.



# Apéndice I







# Materiales y Métodos

## 1.- Lista completa de las ecuaciones del modelo y descripción general

Cada una de las trece ecuaciones diferenciales, del tipo reacción-difusión, describe el comportamiento de un sistema variable (transcripción génica y producción proteica) de una fila de 31 células con una distribución simétrica, donde la fuente del morfógeno aparece centrada (las 5 células centrales). La ecuación 1 describe la evolución clásica del gradiente de un morfógeno (Hh) con términos de producción y de difusión. En el modelo, se incrementó el nivel de complejidad añadiendo una regulación negativa, la formación del complejo Ptc/Hh reduce la concentración de Hh libre dinámicamente. El término de producción está limitado a las células que expresan *hh*, como se recoge en la ecuación 14.

$$\frac{\partial Hh}{\partial t} = D \frac{\partial^2 Hh}{\partial x^2} + \delta(x) \alpha_{hh} - \gamma_{Ptc-Hh} Ptc \cdot Hh - \beta_{Hh} Hh \quad (1)$$

$$\frac{\partial ptc}{\partial t} = \kappa_0 \beta_{ptc} \left\{ \frac{\alpha_{ptc} + \kappa_{Ciptc} \frac{Ci_A^{n_{CiA}} \left( 1 - \frac{Ci_R^{n_{CiR}}}{k_{CiR}^{n_{CiR}} + Ci_R^{n_{CiR}}} \right)^{n_{CiA}}}{k_{CiA}^{n_{CiA}} + Ci_A^{n_{CiA}} \left( 1 - \frac{Ci_R^{n_{CiR}}}{k_{CiR}^{n_{CiR}} + Ci_R^{n_{CiR}}} \right)^{n_{CiA}}} \cdot \left( 1 - \frac{En^{n_{En-ptc}}}{k_{En-ptc}^{n_{En-ptc}} + En^{n_{En-ptc}}} \right) - ptc \right\} \quad (2)$$

$$\frac{\partial Ptc}{\partial t} = \theta_{ptc} ptc - \gamma_{Ptc-Hh} Ptc \cdot Hh - \beta_{Ptc} Ptc \quad (3)$$

$$\frac{\partial PtcHh}{\partial t} = \gamma_{Ptc-Hh} Ptc \cdot Hh - \beta_{PtcHh} PtcHh \quad (4)$$

$$\frac{\partial ci}{\partial t} = \kappa_0 \beta_{ci} \left\{ \frac{\alpha_{ci} \left( 1 - \frac{En^{n_{En-ci}}}{k_{En-ci}^{n_{En-ci}} + En^{n_{En-ci}}} \right)^{n_{ci}}}{k_{ci}^{n_{ci}} + \left( 1 - \frac{En^{n_{En-ci}}}{k_{En-ci}^{n_{En-ci}} + En^{n_{En-ci}}} \right)^{n_{ci}}} - ci \right\} \quad (5)$$



$$\frac{\partial Ci_A}{\partial t} = \kappa_0 \beta_{Ci_A} (\theta_{ci} ci - Ci_A) - \kappa_{Ci} \frac{Ci_A^{n_{Ci_A}} \left( 1 - \frac{\left( \frac{PtcHh}{Ptc} \right)^{n_{PH}}}{k_{PH}^{n_{PH}} + \left( \frac{PtcHh}{Ptc} \right)^{n_{PH}}} \right)^{n_{Ci_A}}}{k_{Ci_A}^{n_{Ci_A}} + Ci_A^{n_{Ci_A}} \left( 1 - \frac{\left( \frac{PtcHh}{Ptc} \right)^{n_{PH}}}{k_{PH}^{n_{PH}} + \left( \frac{PtcHh}{Ptc} \right)^{n_{PH}}} \right)^{n_{Ci_A}}} \quad (6)$$

$$\frac{\partial Ci_R}{\partial t} = \kappa_{Ci} \frac{Ci_A^{n_{Ci_A}} \left( 1 - \frac{\left( \frac{PtcHh}{Ptc} \right)^{n_{PH}}}{k_{PH}^{n_{PH}} + \left( \frac{PtcHh}{Ptc} \right)^{n_{PH}}} \right)^{n_{Ci_A}}}{k_{Ci_A}^{n_{Ci_A}} + Ci_A^{n_{Ci_A}} \left( 1 - \frac{\left( \frac{PtcHh}{Ptc} \right)^{n_{PH}}}{k_{PH}^{n_{PH}} + \left( \frac{PtcHh}{Ptc} \right)^{n_{PH}}} \right)^{n_{Ci_A}}} - \kappa_0 \beta_{Ci_R} Ci_R \quad (7)$$

$$\frac{\partial en}{\partial t} = \kappa_0 \beta_{en} \left\{ \alpha_{en} + \frac{Ci_A^{n_{Ci_A}} \left( 1 - \frac{Ci_R^{n_{Ci_R}}}{k_{Ci_R}^{n_{Ci_R}} + Ci_R^{n_{Ci_R}}} \right)^{n_{Ci_A}}}{k_{Ci_A}^{n_{Ci_A}} + Ci_A^{n_{Ci_A}} \left( 1 - \frac{Ci_R^{n_{Ci_R}}}{k_{Ci_R}^{n_{Ci_R}} + Ci_R^{n_{Ci_R}}} \right)^{n_{Ci_A}}} + \kappa_{En} \frac{En^{n_{En}}}{k_{DlEn}^{n_{En}} + En^{n_{En}}} - en \right\} \quad (8)$$

$$\frac{\partial En}{\partial t} = \theta_{en} en - \beta_{En} En \quad (9)$$

$$(10)$$

$$\frac{\partial eya}{\partial t} = \kappa_0 \beta_{eya} \left\{ \alpha_{eya} + \frac{\alpha_{Toy} Ci_A^{n_{Ci_A}} \left( 1 - \frac{Hth^{n_{Hth}}}{k_{Hth-eya}^{n_{Hth}} + Hth^{n_{Hth}}} \right)^{n_{Ci_A}}}{k_{Ci_A}^{n_{Ci_A}} + Ci_A^{n_{Ci_A}} \left( 1 - \frac{Hth^{n_{Hth}}}{k_{Hth-eya}^{n_{Hth}} + Hth^{n_{Hth}}} \right)^{n_{Ci_A}}} + \frac{Eya^{n_{Eya}}}{k_{Eya}^{n_{Eya}} + Eya^{n_{Eya}}} - eya \right\}$$

$$\frac{\partial Eya}{\partial t} = \theta_{eya} eya - \beta_{Eya} Eya$$

$$\frac{\partial Eya}{\partial t} = \theta_{eya} eya - \beta_{Eya} Eya \quad (11)$$

$$\frac{\partial hth}{\partial t} = \kappa_0 \beta_{hth} \left\{ \alpha_{hth} + \frac{\alpha_{wg} \left( 1 - \frac{Eya^{n_{Eya}}}{k_{Eya-hth}^{n_{Eya}} + Eya^{n_{Eya}}} \right)^{n_{wg}}}{k_{wg}^{n_{wg}} + \left( 1 - \frac{Eya^{n_{Eya}}}{k_{Eya-hth}^{n_{Eya}} + Eya^{n_{Eya}}} \right)^{n_{wg}}} - hth \right\} \quad (12)$$

$$\frac{\partial Hth}{\partial t} = \theta_{hth} hth - \beta_{Hth} Hth \quad (13)$$

$$\delta(x) = \begin{cases} 1 & \text{if } x \in \text{hh-expressing cells} \\ 0 & \text{if } x \notin \text{hh-expressing cells} \end{cases} \quad (14)$$

## Diseño e implementación del modelo matemático ocelar

El diseño de este modelo está basado en ecuaciones diferenciales del tipo reacción-difusión. Consiste en trece ecuaciones, una por cada variable del sistema (transcripción génica y producción proteica) en una fila de 31 células con una distribución simétrica, centrada en torno a una fuente de morfógeno (las 5 células centrales). En términos generales, el modelo se compone de 403 ecuaciones diferenciales ordinarias (EDOs). El diseño del sistema de ecuaciones sigue el paradigma de formulación propuesto por von Dassow y colegas (Dassow et al., 2000). Esta metodología distingue entre transcripción de mRNA y traducción a proteína. La traducción se describe con términos lineales de producción y degradación. La regulación transcripcional se describe con términos no lineales, tanto positivos como negativos, y en la forma de ecuaciones de Hill. La forma específica de este tipo de términos es  $\phi(X\psi((Y,k_2,n_2),k_1,n_1))$ , donde

$$\phi(X,k,n) = \frac{X^n}{k^n + X^n} \quad (s1)$$

y

$$\psi(Y,k,n) = \left( 1 - \frac{Y^n}{k^n + Y^n} \right) \quad (s2)$$

por tanto,



$$\phi(X\psi(Y, k_2, n_2), k_1, n_1) = \frac{X^{n_1} \left( 1 - \frac{Y^{n_2}}{k_2^{n_2} + Y^{n_2}} \right)^{n_1}}{k_1^{n_1} + X^{n_1} \left( 1 - \frac{Y^{n_2}}{k_2^{n_2} + Y^{n_2}} \right)^{n_1}} \quad (\text{s3})$$

El modelo ocelar contiene auto-regulaciones. En estos casos, el término de la ecuación se describe como una sigmoide simple del tipo  $\square(X, k, n)$ . Para cada especie, la ecuación toma la forma específica dependiendo de su estado regulatorio específico (por ejemplo, con o sin término de auto-regulación). El modelo contiene diferentes tipos de parámetros:  $\alpha x$  para tasas de transcripción basal;  $\beta x$  para tasas de degradación;  $n x$  para el coeficiente de Hill;  $\theta x$  para tasas de transducción; y  $\gamma x$  para formación de complejos proteicos. Los parámetros no dimensionales  $k_0$ ,  $k_{Ci}$ ,  $k_{En}$  y  $k_{Ciptc}$  se usan para cambiar la escala de términos diferentes y  $D$  es el coeficiente de difusión. Suscribir  $X$ - $Y$ , con  $X$  e  $Y$  como variables del sistema indican una regulación de  $X$  a  $Y$ . Por ejemplo,  $k_{En-ptc}$  es el parámetro de la regulación transcripcional de Hill de la interacción de  $En$  a  $ptc$ . Todas las ecuaciones de reacción-difusión contienen un término de degradación.

### Análisis de sensibilidad de parámetros: análisis uno a uno

Una vez encontrado el conjunto de parámetros para el tipo salvaje, se evaluó si estos valores eran únicos o, por el contrario, era posible encontrar conjuntos de parámetros diferentes que también mostrasen comportamiento salvaje. Una opción esperada considerando que el desarrollo de un órgano debe estar evolutivamente preparado a permanecer constante de cara a las fluctuaciones (p.ej. ser robusto), ya que algunas de ellas pueden afectar las propiedades bioquímicas de la red genética que controla el desarrollo.

Para analizar esta cuestión se realizó un análisis de sensibilidad de parámetros. Una vez más, el principal problema con el que nos encontramos fue el gran número de parámetros. Por ello se realizó en dos fases. En la primera fase se exploró el espacio paramétrico modificando sólo una dimensión (parámetro) a la vez; el resto de parámetros se fijaron como 'control' o tipo salvaje. Para realizar la exploración se definió un rango de búsqueda para cada parámetro de dos ordenes de magnitud alrededor del valor 'control'. El patrón resultante se comparó con el tipo salvaje y se obtuvo una puntuación de bondad. Esta puntuación representa la distancia euclidiana ( $\lambda$ ) entre el patrón de tipo salvaje para  $Eya$  y el patrón obtenido con el nuevo conjunto de parámetros. Para calcular la pun-

tuación se consideró que tanto el patrón salvaje (A) como el nuevo (B) quedaban descritos mediante dos vectores de 31 parámetros (un componente por cada célula del sistema). Entonces, la distancia entre estos dos vectores se definió como su media euclidiana.

$$\lambda = \left\| \overline{AB} \right\| = \sqrt{\sum_i (b_i - a_i)^2} \quad (s4)$$

donde  $a_i$  and  $b_i$  son las componentes del vector A y B respectivamente. La figura A1 muestra las distribuciones de las distancias (considerada como distancia complementaria,  $1-\lambda$ ) para todos los parámetros del sistema. A partir de este análisis es posible extraer información sobre que parámetros son más o menos sensibles a variaciones que distan de los valores controles. De hecho, a algunos parámetros se le puede considerar insensibles ya que sus distancias no sufren cambios significativos.

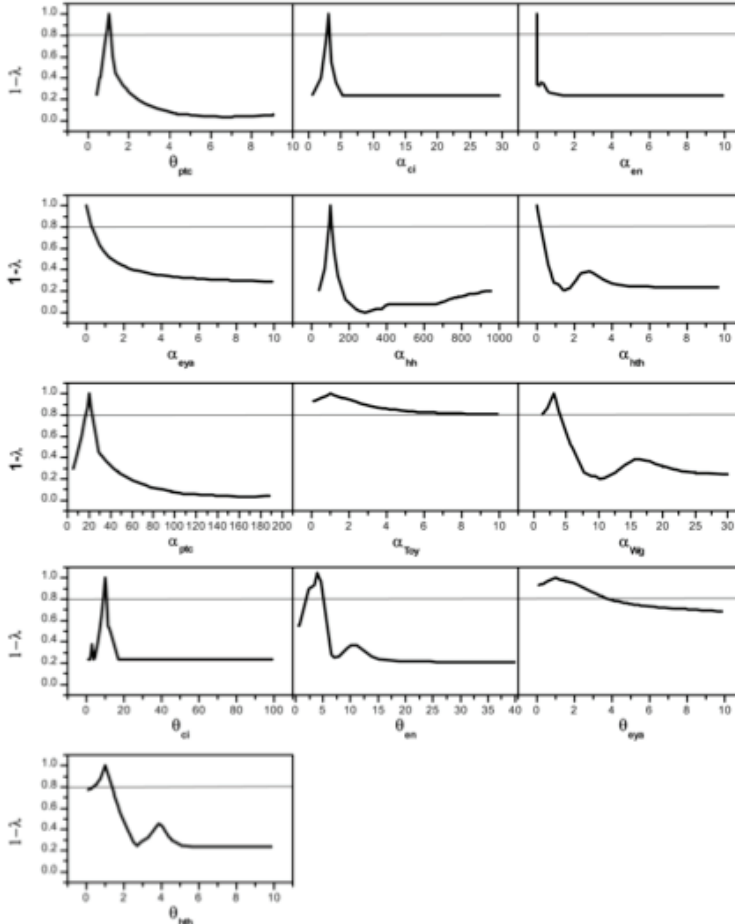




Figura A.1. Gráficas del análisis de sensibilidad paramétrica.

Rango de bondad ( $1-\lambda$ ) para el patrón de Eya como función de los valores paramétricos.  $\lambda$  es la distancia Euclidiana entre el control del patrón Eya y el producido por el nuevo valor del parámetro.  $1-\lambda$  se calcula para cada parámetro en un rango de dos órdenes de magnitud alrededor del valor control del parámetro. La puntuación de la bondad sobre 0.8 (línea) se considera 'bueno' (p. ej. dentro de este rango, la variación del patrón respectivo resulta en la expresión de Eya en un patrón similar al control)

Se seleccionó una distancia complementaria de 0.8 como umbral de bondad, ya que cada patrón comprobado para un conjunto de parámetros con valores de distancia complementaria igual o superior a dicho valor se ajustaba al patrón ocelar objetivo.

Siguiendo este umbral de bondad, se consideraron sensibles todos aquellos parámetros cuya distribución de la distancia fuese menor de 0.8 (33 parámetros) y se consideraron insensibles aquellos cuyos valores permanecían por encima del umbral (28 parámetros). Algunos parámetros eran extremadamente sensibles ya que su rango de variación sobre el umbral era muy pequeño. El parámetro que parecía ser más restrictivo era  $\alpha_{En}$ , responsable de la transcripción basal de *en*. En condiciones salvajes este valor es nulo, hecho predicho por el análisis.

En este punto se determinaron los parámetros que eran sensibles y los que podían variarse sin mayores consecuencias para el patrón final. También se establecieron los rangos dentro de los cuales cada parámetro sensible se podía modificar permaneciendo el patrón en un rango de bondad determinado.

## **Análisis de sensibilidad de parámetros: análisis multiparamétrico**

En la segunda fase del análisis se examinó el espacio paramétrico completo, eliminando los parámetros insensibles y restringiendo los rangos de valores a aquellos con los que se obtuvo un 'buen' patrón. Realizar estas restricciones no asegura obtener un patrón 'bueno', ya que el espacio paramétrico es todavía vasto y la gran complejidad del sistema puede proporcionar valores distantes simplemente modificando dos parámetros simultáneamente. Con la intención de ser capaces de distinguir si el sistema puede evolucionar a patrones 'malos' desde parámetros 'buenos' y si parámetros 'malos' siempre devuelven perfiles 'malos' se realizó una escala de bondad. A partir de los resultados del análisis de sensibilidad paramétrica se calculó, además del rango de bondad, el rango 'medio' (0.6-0.8) y el 'malo' (0.4-0.6).

Se obtuvieron un total de 10,000 ejecuciones distribuidas de la siguiente manera: 6.000 ‘buenas’, 3.000 ‘medias’ y 1.000 ‘malas’. Con este conjunto de 10.000 parámetros se calculó la distancia para todos los patrones del sistema (uno por variable). De esta manera, cada conjunto de parámetros venía definido por un punto en un espacio de 13 dimensiones, siendo cada dimensión una de las variables del modelo.

## Representación bidimensional del análisis de sensibilidad paramétrica

Con la intención de representar el análisis, se definió un método para calcular la distancia global en este hiperespacio y visualizar los resultados en 2D. En primer lugar, la regla euclidiana no distingue signo, es decir, no es posible saber que patrón, el salvaje o el generado al azar, es mayor. Por ello antes de calcular la regla se determinó que patrón definía un área mayor bajo la curva. De esta manera, la distancia entre dos patrones es positiva si el patrón salvaje define un área mayor que el patrón aleatorio.

Considerando una representación 2D de las distancias con signo, el patrón de tipo salvaje aparecería colocados en el punto (0,0). Es posible representar sólo la distancia a partir de dos patrones de los 13 posibles, pero solo mostraría la proyección de los puntos en el espacio de 13 dimensiones en un espacio bidimensional, y esta proyección puede variar dependiendo de las dos dimensiones que se elijan para la representación. Por ello, se implementó un método para visualizar todas las proyecciones al mismo tiempo.

Primero se dividió la distancia normalizada entre 0.1 vez la longitud de los segmentos. Después, se contó el número de puntos en cada cuadrado  $0.1 \times 0.1$  para cada proyección de dos variables. El recuento consideró orden, es decir, la proyección A-B es la misma que B-A y tan solo se contó una vez. Este proceso se repitió para cada cuadrado y para todas las combinaciones posibles de pares de dimensiones. El resultado puede verse en la Figura A.7F y A.8B. El gráfico representa la densidad de los patrones de las 10.000 ejecuciones aleatorias, distribuidas en relación a su distancia con respecto al patrón salvaje. Así, esta representación es una especie de mapa fenotípico producido por la red a partir de conjuntos de parámetros aleatorios.

**Simplificaciones biológicas:** la razón de no incluir proliferación en el modelo bajo estudio es la siguiente: el desarrollo del ocelo ocurre durante la segunda mitad del tercer estadio larvario, es decir, aproximadamente 24h a 25°C. La estimación





de la tasa de doubling en el dominio del ojo es alrededor de 13h (CS Lopes y FC, no publicado). Dado que en la región ocelar no se expresan ni *eyg* ni *upd*, genes implicados en estimular la proliferación celular en el dominio del ojo bajo el control de Notch, es de esperar que la tasa de doubling en la región ocelar sea 13h o más baja, justificando así nuestra conjetura.

### Datos biológicos usados en la realización del modelo de la vía de Hh, incluyendo en

El traductor nuclear de la vía de señalización de Hh es codificado por *ci*. *ci* da lugar a la proteína Ci en su forma no degradada. En ausencia de señal, Ci es proteolíticamente procesado a la forma represora, CiR (Aza-Blanc et al., 1997; Méthot and Basler, 1999). Sin embargo, en presencia de la señal, Ci se convierte en su forma activadora, CiA. La intensidad de la señal de Hh depende de la proporción entre Ptc unido y no unido a Hh (Casali and Struhl, 2004), de manera que cuanto mayor es esta proporción más CiA (y por tanto menos CiR) se produce. Se cree que tanto CiA como CiR se unen a secuencias de DNA similares in vivo para activar y reprimir, respectivamente, un conjunto similar de genes diana. Entre estos genes diana se encuentra *en* y el receptor de Hh *ptc* (Alexandre et al., 1996; Méthot and Basler, 1999; Biehs et al., 2010). En el modelo se ha asumido una regulación similar para *ptc* y *en* en la región ocelar. Además, En puede reprimir la transcripción basal de *ci* (Schwartz et al., 1995). Otro punto clave de esta vía es la regulación de *ptc*. La transcripción de *ptc* se regula de manera positiva por la propia vía de Hh y negativamente por En, esto quiere decir que la proteína de Ptc puede unirse a Hh. El complejo Ptc:Hh se degrada tras la endocitosis, por lo que este paso es irreversible.

### Análisis del estado estacionario del gradiente de Hh

La RIO es la única región del complejo en la que hay transcripción de *hh*, por ello es conocida como la zona de expresión de *hh*. En esta región  $\delta(x) = 1$ . Una vez que el gradiente del morfógeno alcanza su estado estacionario ( $t = t_{\text{test}}$ ) y Ptc es constante, tenemos:

$$\left. \frac{\partial Hh}{\partial t} \right|_{t=t_{\text{test}}} = 0 \quad (\text{s5})$$

y

$$D \frac{\partial^2 Hh}{\partial x^2} + \alpha_{hh} - \gamma_{Ptc\_Hh} [Ptc] \cdot Hh - \beta_{Hh} Hh = 0 \quad (s6)$$

o

$$D \frac{\partial^2 Hh}{\partial x^2} + \alpha_{hh} - (\gamma_{Ptc\_Hh} [Ptc] + \beta_{Hh}) Hh = 0 \quad (s7)$$

La solución a esta ecuación es:

$$D \frac{\partial^2 Hh}{\partial x^2} + \alpha_{hh} - (\gamma_{Ptc\_Hh} [Ptc] + \beta_{Hh}) Hh = 0 \quad (s8)$$

El parámetro  $\lambda = \sqrt{D/(\gamma_{Ptc\_Hh} [Ptc] + \beta_{Hh})}$  es conocido como longitud media y corresponde a la distancia a la cual la concentración del morfógeno disminuye mediante un factor de 1/e.

A partir de la primera ley de Fick podemos afirmar que la tasa de producción del morfógeno viene dada por:

$$\alpha_{hh} = - \frac{\partial Hh}{\partial x} \quad (s9)$$

La dirección del flujo es desde regiones con concentraciones más altas a regiones con concentraciones más bajas, siendo el flujo una magnitud proporcional a la concentración del gradiente. Por tanto:

$$\alpha_{hh} = Hh_0 \sqrt{D(\gamma_{Ptc\_Hh} [Ptc] + \beta_{Hh})} \quad \text{at } x = 0 \quad (s10)$$

entonces,

$$Hh(x) = \frac{\alpha_{hh}}{\sqrt{D(\gamma_{Ptc\_Hh} [Ptc] + \beta_{Hh})}} e^{-\frac{x}{\sqrt{D/(\gamma_{Ptc\_Hh} [Ptc] + \beta_{Hh})}}} - \frac{\alpha_{hh}}{\gamma_{Ptc\_Hh} [Ptc] + \beta_{Hh}} \quad (s11)$$

y

$$Hh_0 = \frac{\alpha_{hh}}{\sqrt{D(\gamma_{Ptc\_Hh} [Ptc] + \beta_{Hh})}} \quad (s12)$$



## Resultados

### Un modelo matemático para el patrón ocelar dirigido por Hh

Para probar si el razonamiento genético era capaz de generar el patrón ocelar, se desarrolló un modelo matemático incorporando todas las interacciones genéticas conocidas (Fig. A.2A). Para ello se realizaron algunas simplificaciones. (1) la región en cuestión se modeló como unidimensional en lugar de bidimensional (Fig. A.2B, como una fila de 31 células); (2) el dominio central de transcripción de *hh* está fijado *de facto* y; (3) el modelo asume que no existe proliferación en el periodo estudiado. La producción de Hh y su difusión se modelaron como en la ec 1 (ver Materiales y Métodos), similar al modelo de formación del gradiente de Hh en el primordio de ala propuesto por Nahmad y Stathopoulos, es decir, considerando un coeficiente de difusión de  $D=0.5\mu\text{m}^2/\text{s}$  (Nahmad and Stathopoulos, 2009). A partir del gradiente de Hh, la transcripción y traducción de todos los genes se modeló usando ecuaciones diferenciales ordinarias (EDOs), principalmente siguiendo el modelo de la red de segmentación embrionaria de *Drosophila* (Dassow et al., 2000). En general, la transcripción de un gen puede estar afectada por la transcripción basal (b) y regulada (T) y por auto-regulación (a), además de por un término de caída (Fig. A.2C). La auto-regulación es sólo relevante para *en* y *eya*. Los términos de regulación transcripcional se modelaron como sigmoides, permitiendo un potencial cooperativo en la activación y represión transcripcional. La forma general de las ecuaciones de transcripción y traducción, así como el conjunto completo de ecuaciones usadas se describen en Materiales y Métodos. A partir de aquí, se explicará como se modelaron los nuevos pasos regulatorios. Detalles concretos sobre los aspectos biológicos que forman la base de otras ecuaciones (ec 2-7) se describen en Materiales y Métodos. El trabajo experimental muestra que la vía de señalización DI/Notch es necesaria para mantener altos niveles de En en la RIO. El mantenimiento de *en* se modeló como una auto-regulación (Ec 8), como se ha demostrado que ocurre en la segmentación del embrión (Heemskerk et al., 1991). La contribución de la vía DI/Notch, entonces, sería facilitar la auto-regulación de *en* haciendo más baja *k* en el término de auto-regulación (lo que indica la concentración de En para la que se ha alcanzado la mitad de la activación,  $k_{DIEn}$ ). Esta implementación es la forma más simple de representar el papel de DI/Notch permitiendo la auto-regulación de *en*. También se consideró una contribución de DI/Notch constante y uniforme, además de independiente a la contribución de *hh*. Se ha demostrado que la expresión de *eya* sólo depende de CiA (Blanco et al., 2009), por lo que no se incluyó contribución de CiR en la regulación de *eya*. Además, para simplificar, el bucle de retro-alimentación positiva *eya-so* (Pauli et al., 2005; Brockmann et

al., 2011) se colapsó como auto-regulación de *eya* (Ec 10). Por otra parte, resultados previos habían sugerido una represión mutua entre *hth* y *eya* (Brockmann et al., 2011), que puede ser directa (Aguilar-Hidalgo et al., 2013), por lo que *hth* se modeló como represor de *eya*. El modelo incluía la transcripción de *hth*, que es positivamente regulada por una constante ( $\alpha_{wg}$ ), dicha constante representa la posible acción de Wnt1/Wingless (Wg) (Azpiazu and Morata, 2000; Casares and Mann, 2000; Pichaud and Casares, 2000).

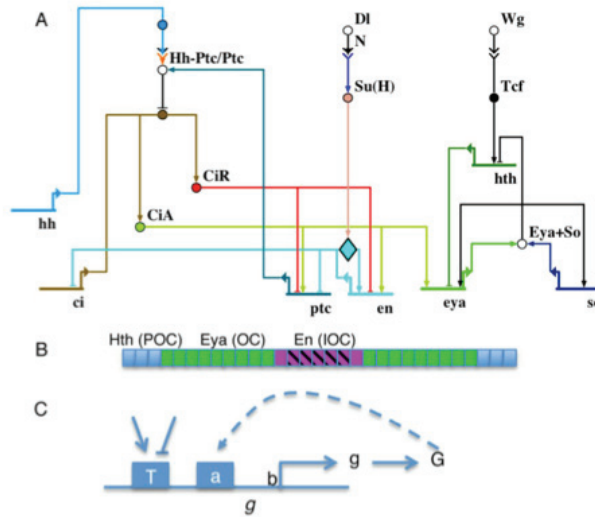


Figura A.2. Red de Regulación y modelo unidimensional.

(A) Diagrama de Biotapestry de la red de regulación. (B) Cuadrícula unidimensional de 31 células. *hh* se transcribe en las cinco células centrales. Se representan los patrones de *Eya* (verde), *En* (magenta) y *Hth* (azul). Estos patrones se corresponden a la región ocelar (OC), interocelar (IOC) y periocelar (POC), respectivamente. (C) Modelo génico genérico (*g*). Se indican los productos de los transcritos (*g*) y las proteínas (*G*). La tasa de transcripción se dicta mediante la tasa de transcripción basal ('*b*'), la regulación de la transcripción, tanto positiva como negativa ('*T*'), y la auto-regulación ('*a*').

El modelo tiene 61 parámetros libres. Para alguno de ellos, el conocimiento biológico previo resultó útil para definir algunos rangos. Por ejemplo, el índice de transcripción basal de *ptc* y *ci* es positivo ya que estos genes son ampliamente transcritos. Con la intención de generar un conjunto de valores paramétricos de trabajo que resultase en el patrón de tipo salvaje (Fig. A.2B, siete células pertenecientes a la RIO y dos parches de nueve células cada uno), se construyó primero un modelo de una célula en la que se realizó la primera exploración de parámetros, para después usar este conjunto de parámetros como punto de comienzo para afinar, manualmente, los valores paramétricos del modelo completo hasta alcanzar el patrón control (ver Materiales y Métodos para detalles concre-



tos). Con este conjunto de valores paramétricos (Tabla A.1) el modelo era capaz de recapitular el patrón de los genes diana, incluyendo la expresión dinámica de Eya, Ptc, CiA, En y Hth (Fig. A.3 y A.4). El modelo indica que antes de alcanzar el estado estacionario, el gradiente de Hh sufre una expansión temporal (Fig A.3A y A.3B). Esta temprana dinámica depende del bucle de retroalimentación no lineal mediado por Ptc (Casali and Struhl, 2004; Nahmad and Stathopoulos,

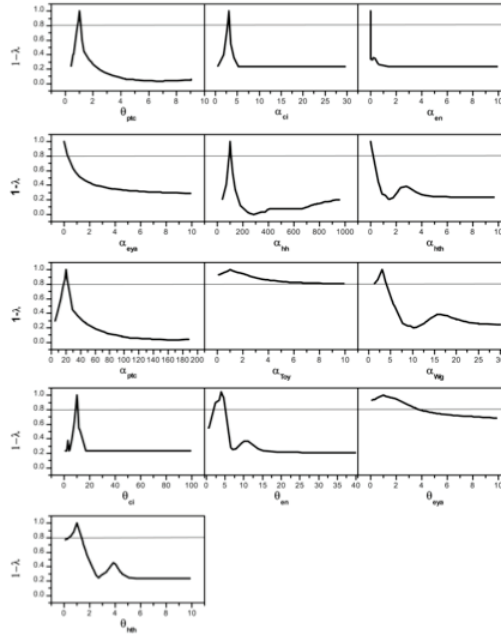


Tabla A.1.

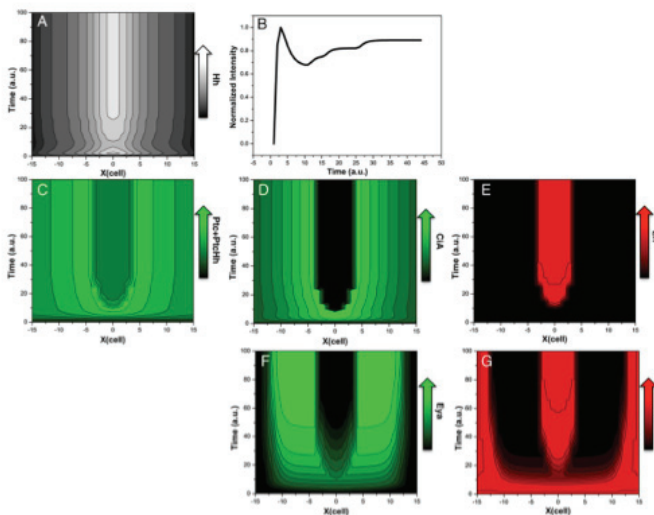


Figura A.3

Figura A.3. Dinámica espacio-temporal del gradiente de Hh y variables del modelo

(A) Representación de la superficie de contorno mostrando la dinámica del gradiente de Hh. (B) Variación temporal de la concentración de Hh (intensidad normalizada) en la célula 5. La magnitud del gradiente de Hh varía con el tiempo con un pico máximo temprano, seguido por una retracción hasta alcanzar el estado estacionario. (C-G) Representación de la superficie de contorno para el conjunto de parámetros de la situación salvaje representando la dinámica de las variables que han sido experimentalmente analizadas: Ptc total (Ptc+Ptc:Hh; C), CiA (D), En (E), Eya (F) y Hth (G). Con este conjunto de parámetros el modelo predice correctamente el patrón biológico a nivel cualitativo (a.u.: unidades arbitrarias). El número de células se representa en el eje x.

2009). El modelo también predice comportamientos mutantes observados experimentalmente, incluyendo la expansión del tejido ocelar, a expensas de la cutícula interocelar en mutantes de pérdida de función *DI* y *en* o el efecto de *hth* en el tamaño ocelar (Fig. A.5).

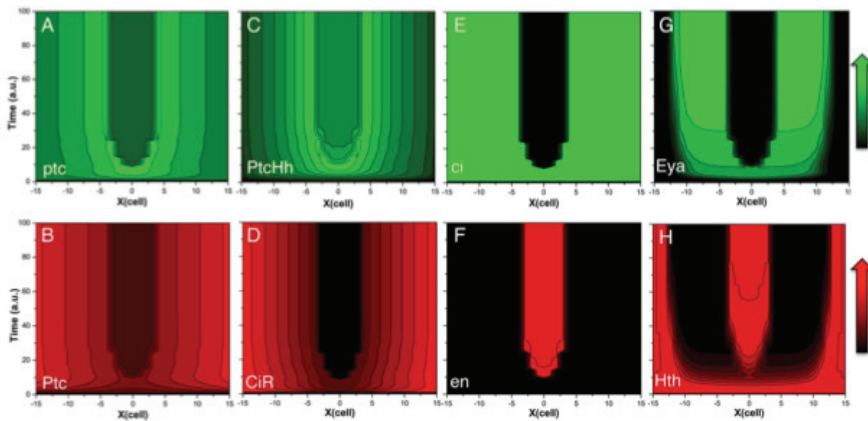


Figura A.4. Dinámica espacio-temporal de las variables del modelo

Representación de la superficie de contorno mostrando el patrón espacio-temporal de las variables del modelo no descritas en el Fig. A.3. Los nombres en mayúsculas indican productos de proteínas y en minúsculas transcritos. (a.u.: unidades arbitrarias). El número de células se representa en el eje x.

## El modelo es robusto frente a variaciones en condiciones iniciales y de ruido

Una prueba importante para cualquier sistema es la estabilidad de su solución y si esta solución es única o no. Para probar este punto, la condición inicial de cada sistema variable se distribuyó al azar (hasta un cambio 10 veces mayor) en cada célula individual. Se obtuvo una solución estable, con patrones similares al de tipo salvaje (Fig. A.6A). Únicamente cuando la condición inicial para *En* excedía de la concentración determinada por el parámetro  $kDI_{En}$ , responsable de la auto-regulación de *En* ( $kDI_{En} > 0.2$ ), la expresión de *en* aparecía fijada en toda la región, excluyendo el patrón de *eya*, como era de esperar (Fig. A.6B y

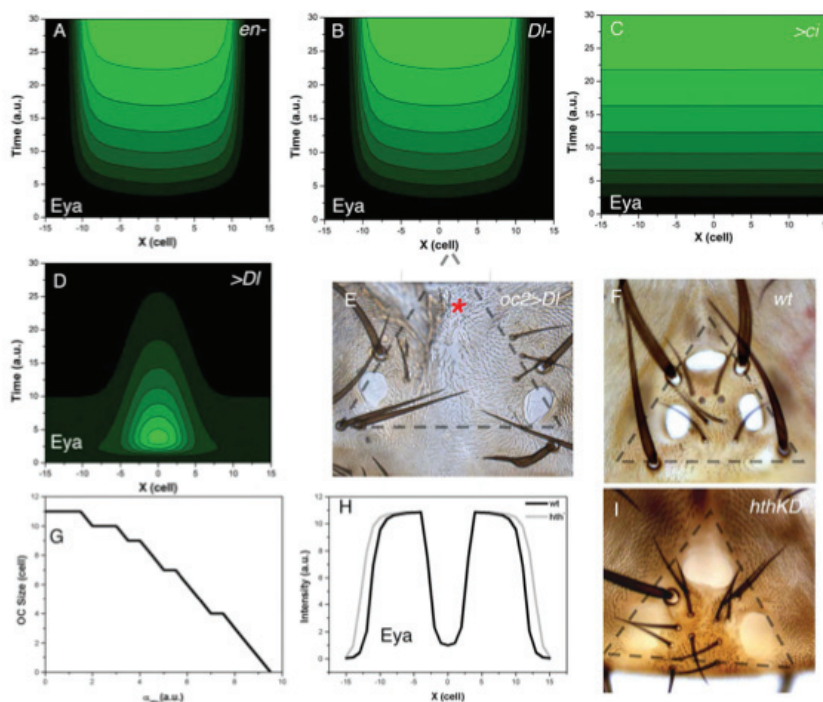


Figura A.5. Análisis de genotipos mutantes.

(A-D) Dinámica espacio-temporal de la expresión de Eya predicha en los mutantes modelados, como se indica en cada panel. La simulación de la pérdida de *en* (A) y *DI* (B) reproduce cualitativamente el resultado mostrado en la Fig. 1.4D y Fig. 1.6A y F (expansión del dominio ocelar/Eya y pérdida de la RIO). La sobre-expresión de *ci* (C) resulta en la extensión del tejido ocelar, como se observa experimentalmente (Fig. 1.5C). (D) El modelo predice una expansión de la RIO a expensas del dominio de expresión de Eya en la sobre-expresión de *DI*. (E, F) Cuando esta predicción se probó in vivo, la sobre-expresión de *DI* (*oc2>DI*) resultó en la expansión de la RIO y la pérdida del ocelo anterior (asterisco). El ocelo posterior, aunque deformados, permanecen (comparar E y F). (G) La expresión de *hth* regula el tamaño de los dominios ocelares, de manera que si la transcripción de *hth* incrementa (p. ej. El incremento *awg*) el dominio ocelar (el número de células que expresan Eya) decrece. (H) Cuando la transcripción de *hth* se bloquea, el dominio de Eya se expande. (I) Una situación similar se detecta mediante la inducción del knock-down de la expresión de *hth* (*oc2>hthRNAi*).

A.6C). De hecho, la expresión de *en* no se detecta en la región ocelar hasta la mitad del tercer estadio larvario, una vez que la expresión de *eya* se incrementa uniformemente en esta región (Azpiazu and Morata, 2000).

Después, para probar si la topología de la red era robusta a fluctuaciones, se perturbaron todos los parámetros relacionados con las tasa de producción y degradación ( $\alpha$ ,  $\theta$ ,  $\beta$ ) con una señal aleatoria (ruido blanco). La amplitud del ruido fue de un 20% para cada término (Fig. A.7A). Estas fluctuaciones alteraron la evolución de la red como se muestra en la serie temporal de Eya de la Fig. A.7B. Bajo estas condiciones, el sistema reprodujo el patrón ocelar con ligeras desviaciones (ensanchamiento) de la RIO.



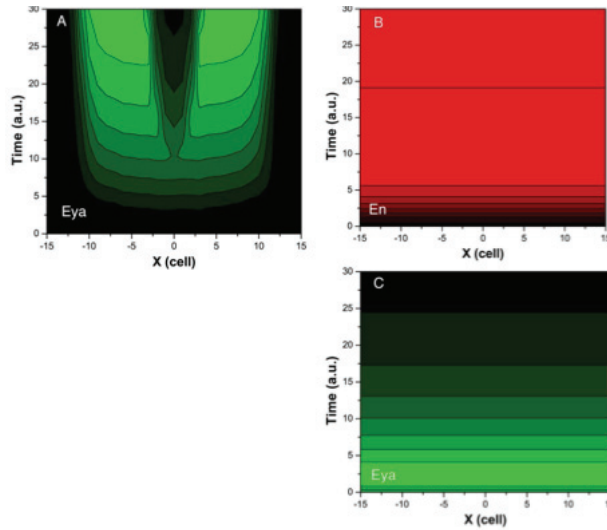


Figura A.6. Convergencia del patrón salvaje con la variación de las condiciones iniciales.

(A-C) Representación de la superficie de contorno mostrando el patrón espacio-temporal de las variables del modelo. (A) Evolución del patrón de Eya cuando el valor inicial de todas las variables del sistema fue aleatorio en cada célula individual. Las condiciones iniciales diferentes aplicadas a cada célula describe una fluctuación en el patrón espacio-temporal en el primer paso. Estas fluctuaciones se suavizan con el tiempo cuando el sistema converge a una solución estacionaria estable. (B, C) Evolución de En (B) y Eya (C) cuando la condición inicial para En excede la concentración determinada por el parámetro  $kDIEn$ , responsable de la auto-regulación de En ( $kDIEn > 0.2$ ).

## La exploración del espacio paramétrico sugiere que la red impone restricciones en la variación fenotípica.

A continuación se realizó un ensayo de sensibilidad paramétrica. Primero, y empezando por nuestro propio conjunto de parámetros, se varió un parámetro cada vez, en un rango de dos ordenes de magnitud, alrededor del valor del tipo salvaje y se midió la divergencia que esta variación causaba con respecto al patrón del tipo salvaje. Como medida de esta desviación se calculó la bondad como la distancia ( $\lambda$ ) entre el patrón Eya de tipo salvaje y el obtenido con el parámetro variado, ambos normalizados. Se establecieron tres límites para el complementario de esta distancia ( $1-\lambda$ ):  $1-\lambda \geq 0.8$  ('bueno'),  $0.8 > 1-\lambda \geq 0.6$  ('medio') y  $0.6 > 1-\lambda \geq 0.4$  ('malo'), siendo  $1-\lambda \geq 0.8$  el rango más preciso. (Fig. A.7D, A.7E; Tabla A.1). Veintiocho de los 61 parámetros dieron valores de bondad por encima de 0.8, algunos varios ordenes de magnitud por encima y fueron clasificados como 'insensibles' (p.ej., grandes variaciones en sus valores no resultaron en una mayor desviación de su patrón diana) (Fig. A.7E, Tabla A.1). El resto (33) fueron sensibles (Fig. A.7D), aunque el rango de valores para cada parámetro específico dio lugar a una variación entre ellos de al menos 0.8 (Tabla A.1). El

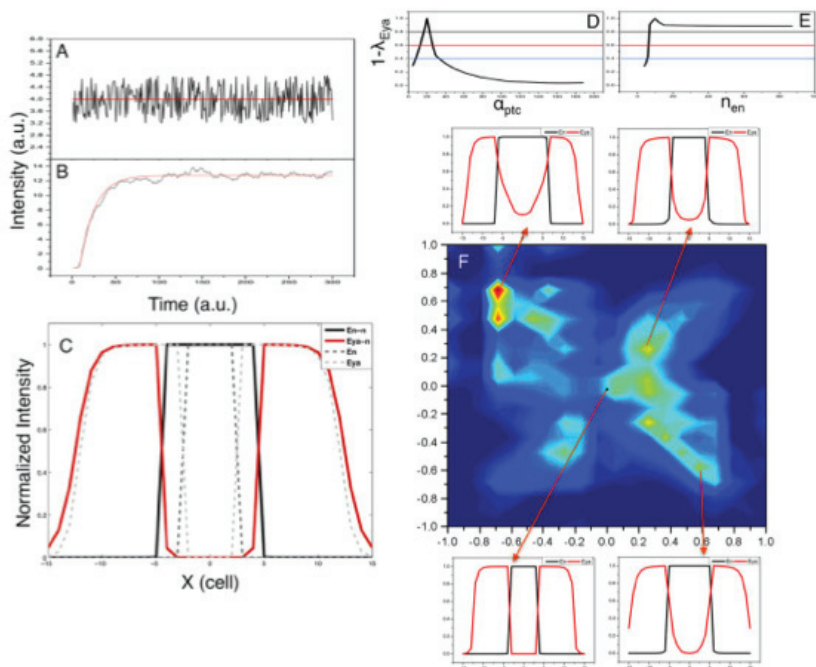


Figura A.7. Análisis de la robustez del modelo contra el ruido y variaciones en los parámetros.

(A) Aplicación de la distribución de ruido blanco de 20% de amplitud a  $\theta_{en}$  como un ejemplo de implementación de ruido. (B) Serie de tiempo con y sin tasa de ruido, mostrada en negro y rojo. (C) Patrones de Eya (rojo) y En (negro) cuando se le aplica ruido (continuo) o sin ruido (discontinuo). Tasas con ruidos resultan en RIO ligeramente extendidas. (D, F) Ejemplos de la distancia complementaria cuando se varía cada parámetro en el tiempo sobre un rango de dos órdenes de magnitud. (D)  $q_{ptc}$  presenta un rango estrecho para los patrones 'bueno', 'medio' y 'malo' [límites negros ( $>0.8$ ), rojo (0.6-0.8) y azul (0.4-0.6), respectivamente], mientras (E)  $n_{en}$  permanece en el rango 'bueno' en la mayoría del rango estudiado. (F) Diagrama de densidad de 10.000 puntos en un espacio de 13 dimensiones correspondiente a la distancia de los 13 patrones variables de la condición salvaje (punto negro, situado en el punto 0,0). También se muestran algunos patrones de Eya y En, correspondientes a la condición salvaje y tres casos adicionales.

parámetro más sensible resultó ser la constante de la transcripción basal  $a_{en}$ , que es justo el parámetro que no permite variaciones en los experimentos de ruido. Esto sugiere que la transcripción de *en* está estrictamente apagada en ausencia de la señal de Hh. No es sorprendente que otros parámetros sensibles sean los relacionados con la expresión de *ptc* y *ci*, ya que afectan los principales bucles de la red (Tabla A.1).

En segundo lugar, se realizó un análisis en el que los 33 parámetros sensibles fueron distribuidos al azar simultáneamente dentro de cada intervalo de bondad (el resto de parámetros se fijaron en sus valores de tipo salvaje). Se obtuvieron un total de 10.000 ejecuciones, distribuidas entre 'bueno' (6.000), 'medio' (3.000) y 'malo' (1.000). Para todo el conjunto de parámetros se calculó

la distancia de cada patrón del sistema (uno por variable) con respecto al patrón salvaje. De esta manera cada conjunto de parámetros define un punto en un espacio de 13 dimensiones, siendo cada dimensión una variable del modelo (ver Materiales y métodos). Para su mejor visualización, dicha información se redujo a un espacio tridimensional, donde dos de ellas representan las proyecciones de la distancia de las distribuciones dos a dos y la otra representa la densidad de los puntos multidimensionales en tales proyecciones. El histograma 2D resultante (Fig. A.7F y A.8) representa la densidad de los patrones de las 10.000 ejecuciones aleatorias, distribuidos en relación a su distancia con el patrón de tipo salvaje (punto 0,0). Por lo tanto, el gráfico representa un mapa del espacio fenotípico, generado por la red de regulación génica (RRG), usando un conjunto de parámetros distribuidos al azar. Varias conclusiones pueden inferirse de este análisis: (1) la distribución de las soluciones (patrones) no resulta en una dispersión uniforme, de hecho, las soluciones tienden a concentrarse en grupos o 'islas'; (2) el patrón de tipo salvaje quedó colocado dentro de un grupo grande y denso, por lo que esta solución es altamente probable, e indica que el patrón es estable y; (3) cuando se analizaron los patrones de Eya y En (dos de las principales muestras de actividad de la red), localizados en 'islas' densas distintas a la salvaje, se observó que esos patrones eran cualitativamente similares al patrón salvaje (Fig A.7F; ver p.ej. la alta estabilidad del grupo localizado -0.7,0.7 en Fig. A.8B). En resumen, estos análisis indican que la RRG es robusta, ya que una variación de parámetros amplia y aleatoria resulta en grupos fenotípicos específicos, todos ellos similares al patrón de tipo salvaje.

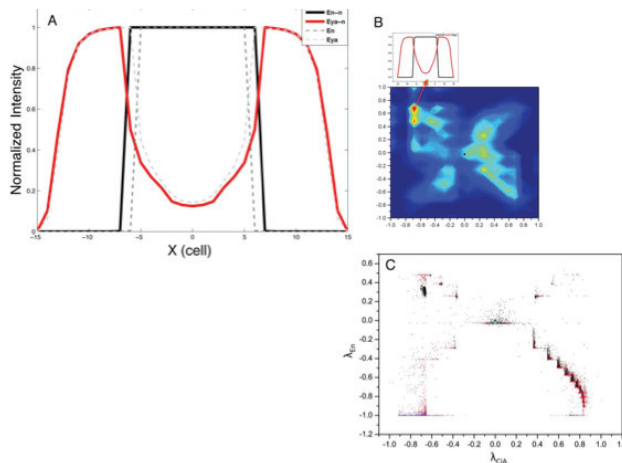


Figura A.8. Análisis de los patrones de densidad

(A, B) El efecto del ruido en los perfiles de En y Eya (A) sobre un patrón específico (B) situado en un grupo 'lejano', en la distancia global desde la condición salvaje (0,0). (C) Proyección de la solución de 10.000 puntos, correspondientes a una variación aleatoria de todos los parámetros sensibles en rangos con distancia complementaria con valor  $>0.8$  (puntos negros), entre 0.6 y 0.8 (puntos rojos) y entre 0.4 y 0.6 (puntos azules). La proyección se llevó a cabo en los patrones de En y CiA.



## REFERENCIAS

Aguilar-Hidalgo, D., Domínguez-Cejudo, M. A., Amore, G., Brockmann, A., Lemos, M. C., Córdoba, A., and Casares, F. (2013). A Hh-driven gene network controls specification, pattern and size of the *Drosophila* simple eyes. *Development* 140, 82-92.

Alexandre, C., Jacinto, A., and Ingham, P. W. (1996). Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes Dev.* 10, 2003-2013.

Aza-Blanc, P., Ramírez-Weber, F. A., Laget, M. P., Schwartz, C., and Kornberg, T. B. (1997). Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* 89, 1043-1053.

Azpiaz, N., and Morata, G. (2000). Function and regulation of homothorax in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Development* 127, 2685-2693.

Biehs, B., Kechris, K., Liu, S., and Kornberg, T. B. (2010). Hedgehog targets in the *Drosophila* embryo and the mechanisms that generate tissue-specific outputs of Hedgehog signaling. *Development* 137, 3887-3898.

Blanco, J., Seimiya, M., Pauli, T., Reichert, H., and Gehring, W. J. (2009). Wingless and Hedgehog signaling pathways regulate orthodenticle and eyes absent during ocelli development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 329, 104-115.

Brockmann, A., Domínguez-Cejudo, M. A., Amore, G., and Casares, F. (2011). Regulation of ocellar specification and size by twin of eyeless and homothorax. *Dev. Dyn.* 240, 75-85.

Casali, A., and Struhl, G. (2004). Reading the Hedgehog morphogen gradient by measuring the ratio of bound to unbound Patched protein. *Nature* 431, 76-80.

Casares, F., and Mann, R. S. (2000). A dual role for homothorax in inhibiting wing blade development and specifying proximal wing identities in *Drosophila*. *Development* 127, 1499-1508.

Dassow, von, G., Meir, E., Munro, E. M., and Odell, G. M. (2000). The segment polarity network is a robust developmental module. *Nature* 406, 188-192.

Heemskerk, J., DiNardo, S., Kostriken, R., and O'Farrell, P. H. (1991). Multiple modes of engrailed regulation in the progression towards cell fate determination. *Nature* 352, 404-410.

Méthot, N., and Basler, K. (1999). Hedgehog Controls Limb Development by Regulating the Activities of Distinct Transcriptional Activator and Repressor Forms of *Cubitus interruptus*. *Cell* 96, 819-831.

Nahmad, M., and Stathopoulos, A. (2009). Dynamic interpretation of hedgehog signaling in the *Drosophila* wing disc. *PLoS Biol.* 7, e1000202.

Pauli, T., Seimiya, M., Blanco, J., and Gehring, W. J. (2005). Identification of functional sine oculis motifs in the autoregulatory element of its own gene, in the eyeless enhancer and in the signalling gene hedgehog. *Development* 132, 2771-2782.

Pichaud, F., and Casares, F. (2000). *homothorax* and *iroquois-C* genes are required for the establishment of territories within the developing eye disc. *Mech. Dev.* 96, 15-25.

Schwartz, C., Locke, J., Nishida, C., and Kornberg, T. B. (1995). Analysis of *cubitus interruptus* regulation in *Drosophila* embryos and imaginal disks. *Development* 121, 1625-1635.



# Apéndice II





# A Hh-driven gene network controls specification, pattern and size of the *Drosophila* simple eyes

Daniel Aguilar-Hidalgo<sup>1,2,\*</sup>, María A. Domínguez-Cejudo<sup>1,\*</sup>, Gabriele Amore<sup>3</sup>, Anette Brockmann<sup>1,†</sup>,  
 María C. Lemos<sup>2</sup>, Antonio Córdoba<sup>2</sup> and Fernando Casares<sup>1,§</sup>

## SUMMARY

During development, extracellular signaling molecules interact with intracellular gene networks to control the specification, pattern and size of organs. One such signaling molecule is Hedgehog (Hh). Hh is known to act as a morphogen, instructing different fates depending on the distance to its source. However, how Hh, when signaling across a cell field, impacts organ-specific transcriptional networks is still poorly understood. Here, we investigate this issue during the development of the *Drosophila* ocellar complex. The development of this sensory structure, which is composed of three simple eyes (or ocelli) located at the vertices of a triangular patch of cuticle on the dorsal head, depends on Hh signaling and on the definition of three domains: two areas of *eya* and *so* expression – the prospective anterior and posterior ocelli – and the intervening interocellar domain. Our results highlight the role of the homeodomain transcription factor *engrailed* (*en*) both as a target and as a transcriptional repressor of *hh* signaling in the prospective interocellar region. Furthermore, we identify a requirement for the *Notch* pathway in the establishment of *en* maintenance in a Hh-independent manner. Therefore, *hh* signals transiently during the specification of the interocellar domain, with *en* being required here for *hh* signaling attenuation. Computational analysis further suggests that this network design confers robustness to signaling noise and constrains phenotypic variation. In summary, using genetics and modeling we have expanded the ocellar gene network to explain how the interaction between the Hh gradient and this gene network results in the generation of stable mutually exclusive gene expression domains. In addition, we discuss some general implications our model may have in some Hh-driven gene networks.

**KEY WORDS:** Ocellus, *hedgehog*, Patterning, Mathematical model, Retinal determination genes, Gene network, *Drosophila*, *engrailed*, *Notch*

## INTRODUCTION

During development, gradients of intercellular signals (called morphogens) are read and modified dynamically by fields of target cells. As a result, spatiotemporal patterns of gene expression are generated. These patterns are then translated into cell function and into the development of functional body structures (Freeman and Gurdon, 2002; Davidson, 2006). Yet how the integration between intercellular signals and intracellular gene networks occurs is only beginning to be understood.

One of the best characterized family of morphogens is that of *hedgehog* (*hh*). Hh genes are evolutionarily conserved and participate in many key developmental processes. Not surprisingly, their malfunction has been associated with a number of developmental diseases and with cancer (Jiang and Hui, 2008; Varjosalo and Taipale, 2008; Ingham et al., 2011). Experimental work in *Drosophila* and in vertebrates indicates that the Hh signaling pathway is subject to extensive feedback among elements of the pathway, most notably that of the Hh receptor *patched* (*ptc*) (Chen and Struhl, 1996; Marigo and Tabin, 1996). Furthermore, the combination of experimental and modeling studies on developing fly wings and on vertebrate neural tube and limbs have uncovered new roles for this feedback in the dynamics of Hh gradient formation, in

its robustness and in the generation of distinct patterns of target gene expression (Briscoe et al., 2001; Saha and Schaffer, 2006; Dessaud et al., 2007; Dessaud et al., 2008; González et al., 2008; Nahmad and Stathopoulos, 2009; Dessaud et al., 2010; Irons et al., 2010; Probst et al., 2011; Balaskas et al., 2012). Therefore, the iteration between mathematical modeling and experimentation is emerging as a productive way of illuminating the problem of Hh morphogen action during organ growth and patterning. Here, we investigate this issue in a particularly simple and genetically tractable model organ: the *Drosophila* ocellar complex.

The *Drosophila* ocelli are three simple eyes [one anterior (or medial) ocellus and two posterior (or lateral) ocelli] located at the vertices of a triangular patch of cuticle on the dorsal head. Together, the ocelli and the interocellar cuticle (plus its bristles) are referred to as the ‘ocellar complex’ (Fig. 1A). The development of the ocellar complex depends on *hh*. Flies homozygous for a *hh* temperature-sensitive mutation raised at the restricted temperature during larval development (Royet and Finkelstein, 1996) or expressing a dominant-negative Ptc receptor [Ptc $\Delta$ loop2 (Briscoe et al., 2001)] lack the ocellar complex (Fig. 1B). Therefore, *hh* signaling is required for the specification and pattern of two tissue types: ocellus and interocellar cuticle.

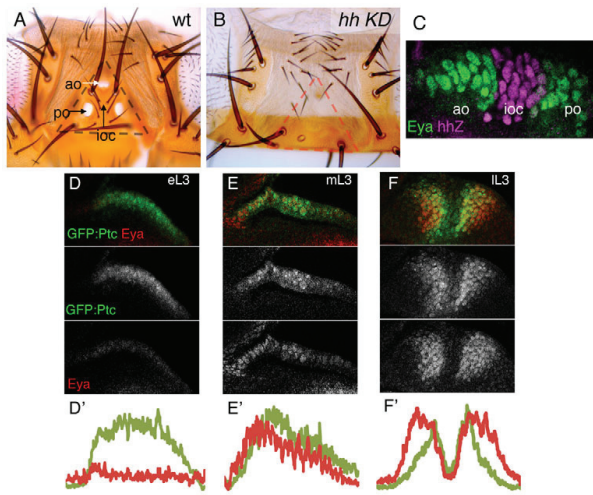
The ocellar complex forms by the fusion of the dorsal-anterior domains of the eye discs (Haynie and Bryant, 1986). Here, the ocellar field is specified by the action of, at least, two transcription factors: the *pax6* gene *twin of eyeless* (*toy*) and the Otx family member *orthodenticle* (*otd*) (*ocelliless*, *oc* – FlyBase) (Finkelstein et al., 1990; Wieschaus et al., 1992; Royet and Finkelstein, 1995; Punzo et al., 2002; Blanco et al., 2010; Wang et al., 2010; Brockmann et al., 2011). *hh* is expressed within the ocellar field in the prospective interocellar region (Royet and Finkelstein, 1996;

<sup>1</sup>CABD (CSIC-UPO-Junta de Andalucía), Sevilla 41013, Spain. <sup>2</sup>Condensed Matter Physics Department Universidad de Sevilla, Sevilla 41012, Spain. <sup>3</sup>Istituto Regionale Vini e Oli di Sicilia, Palermo 90143, Italy.

\*These authors contributed equally to this work

<sup>†</sup>Present address: University of Konstanz, Konstanz 78457, Germany

<sup>§</sup>Author for correspondence (fcasfer@upo.es)



**Fig. 1. Dynamic *hh* signaling and the development of the ocellar complex.** (A, B) Dorsal views of adult heads from wild-type (A) or *oc2>ptcΔloop2* (*hh* signaling knock down; *hhKD*). The ocellar complex is outlined by the triangle. Anterior ocellus (ao), posterior ocellus (po) and interocellar cuticle (ioc) are marked. All elements of the ocellar complex are obliterated when the *hh* signaling pathway is blocked. (C) Ocellar region of a late L3 disc from a *hhZ* larva. The β-galactosidase-expressing domain (magenta; *hhZ*) labels the prospective interocellar cuticle (ioc) and is flanked by two domains of *Eya* expression (green) in the prospective anterior (ao) and posterior (po) ocelli. This orientation (anterior towards the left) will be maintained throughout. (D-F') Prospective ocellar regions of early ('e', D), mid ('m', E) and late ('l', F) third instar (L3) GFP:Ptc larvae, stained for anti-Eya. GFP signal was detected directly. Merged and single channels are shown. Below, signal intensity histograms of both GFP:Ptc (green) and *Eya* (red) signals of the respective discs. GFP:Ptc, which is used as a read-out of the Hh signaling, is initially expressed at high and uniform levels throughout the region (D-E'), to later evolve into a high-low-high pattern (F,F'). *Eya* expression is detected at low and uniform levels in eL3 (D,D'), to then increase as a single domain in mL3 (E,E'), which is later transformed into a high-low-high pattern similar to Ptc (F,F').

Royet and Finkelstein, 1997). The retinal determination (RD) genes *eyes absent* (*eya*) and *sine oculis* (*so*) are required for the formation of the ocelli (Bonini et al., 1993; Cheyette et al., 1994; Serikaku and O'Tousa, 1994; Bonini et al., 1998; Blanco et al., 2009; Blanco et al., 2010; Brockmann et al., 2011). Both *eya* and *so* are expressed with identical patterns in two domains flanking *hh*, and mark the prospective ocelli in late third larval (L3) stage discs (Blanco et al., 2009). The expression of *eya* and *so* depends on secreted Hh and on their mutual positive feedback (Pauli et al., 2005; Blanco et al., 2009). In addition to the activation of *eya* and *so*, expression of the TALE-homeodomain transcription factor *homothorax* (*hth*) is concomitantly repressed in the ocellar domains. Otherwise, maintenance of *hth* expression prevents ocellar development (Brockmann et al., 2011).

In this paper, we have investigated how the single domain of *hh* expression is capable of generating the ocellar pattern through the regulation of a downstream gene network using both genetic and modeling approaches.

## MATERIALS AND METHODS

### *Drosophila* strains and genetic manipulations

*oc2-GAL4* (Blanco et al., 2009) was used to drive UAS lines specifically in the developing dorsal anterior region of the eye-antennal imaginal disc (EAD), where the ocellar region derives from. In the case of UASdsRNAi strains, crosses were raised at 29°C, to maximize the penetrance of the knock-downs. Other crosses were set at 25°C. UAS lines used were as follows: UAS-GFP-*ptcΔloop2* [UAS-*ptcDN* (Briscoe et al., 2001)], UAS-*ci* (Alexandre et al., 1996), UAS-*mamDN* (dominant negative) (Kumar and Moses, 2001) and UAS-*en* (Guillén et al., 1995; Tabata et al., 1995); the *hedgehog* transcriptional reporter line *hh<sup>P30</sup>* (referred to herein as *hh-Z*) and the *engrailed* transcriptional reporter line *en<sup>Xho25</sup>* (referred to herein as *en-Z*), which are from the Bloomington Stock Center (<http://flystocks.bio.indiana.edu>); and UAS-*D/RNAi* (28032) and UAS-*Su(H)RNAi* (103597), which are from the VDRC (<http://stockcenter.vdrc.at/control/main>). The GFP:Ptc strain [CB02030 from Flytrap (<http://flytrap.med.yale.edu/>) (Buszczak et al., 2007)] is a GFP-protein trap that tags the Ptc product. Two reference strains, Oregon-R (Or-R) and *w<sup>1118</sup>*, and stocks carrying mutant alleles for *patched* [*ptc*: *yw*; *FRT42D ptc<sup>S2</sup>/CyO* (BL # 6332)], *smoothed* [*smo*: *w*; *smo<sup>3</sup> FRT40A/CyO*], *cubitus interruptus* [*ci*: *yw;hslp*; *Ci<sup>+</sup> FDT40A/CyO*; *Ci<sup>B4</sup>*] and *Notch* [*N*: *w[ch2]*, *N<sup>264-39</sup>/FM4*, *B[+]* (BL # 730)] are described in FlyBase.

The flip-out method (Basler and Struhl, 1994) was used to induce gain-of-function clones. Clones were induced 48-72 hours after egg laying (AEL) by a 10 heat-shock at 35.5°C in larvae from the cross of *yw*; *hs-flp*, *act>hsCD2>Gal4*; UAS-*lacZ* females with UAS-*hthGFP* males (*hth+* clones) or *yw*; *hs-flp*, *act>hsCD2>Gal4*; UAS-GFP females with UAS-*en* males (*en+* clones). *en* loss-of-function clones were generated through mitotic recombination (Xu and Rubin, 1993) in *yw*; *hs-flp*; *FRT42D Df(2R)en<sup>8</sup>/FRT42D*, *ubiGFP* larvae. *Df(2R)enE* deletes both the *engrailed* and *invected* paralogous genes (described in FlyBase). Clones were induced 48-72 hours AEL by a 45 heat-shock at 37°C. Clones were marked in larval tissues by the absence of GFP. Adult heads from this experiment were mounted and their dorsal head examined for ocellar field defects. Clones were not marked in the adult.

### Adult cuticle preparation and quantifications

Dorsal head cuticle pieces were dissected from adult or late pharate heads in PBS, and mounted in Hoyers solution:acetic acid (1:1), as described previously (Casares and Mann, 2000). Images were obtained in a Leica DM500B microscope with a Leica DFC490 digital camera and processed with Adobe Photoshop. Ocellar (longest axis) and interocellar lengths were measured with ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) on digital images and expressed in pixels.

### Immunostaining and imaging

Immunofluorescence was carried out as described previously (Bessa and Casares, 2005). Antibodies used were: guinea pig anti-Hth (Casares and Mann, 2000), guinea pig anti-So (Mutsuddi et al., 2005), rabbit anti β-galactosidase (Cappel), mouse anti-Ptc (Nakano et al., 1989), mouse anti-Eya (10H6), mouse anti-En (4D9), mouse anti-Dl (C594.9B) and rat anti-CiA (2A1) [which detects the activator form of Ci (Aza-Blanc et al., 1997; Méthot and Basler, 1999); all from the Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa (<http://dshb.biology.uiowa.edu>)]. Appropriate Alexa-conjugated secondary antibodies were used. Nuclei were counterstained with DAPI. Image acquisition was carried out in an Apotome Zeiss Axio Imager M2 fluorescence microscope and a Leica SME confocal system. Images were processed with Adobe Photoshop.

### Expression profiles

Confocal sections of GFP:ptc eye discs at different stages of L3 development, and co-stained with anti-Eya, were selected. To ensure that only signal coming from the prospective ocellar regions were analyzed, each of these regions was outlined with the lasso tool, copied and pasted on a black background and saved as a TIFF file, using Adobe Photoshop. The expression profiles were obtained from these TIFF files using ImageJ.

**Temperature fluctuation assay**

A temperature fluctuation assay was carried out essentially as previously (Li et al., 2009). Embryos were collected for 24 hours (at 25°C) and grown for an additional 24 hours at 25°C and then transferred to 31°C until larvae reached third instar. Then, larvae were subjected to five cycles of temperature pulses (1.5 hours at 18°C + 1.5 hours at 31°C). After these pulses, cultures were maintained at 25°C until eclosion. As controls, the same strains were grown at constant 25°C throughout development.

**Model implementation**

A simplified one-cell model (13 equations) was implemented using Vensim software, a visual tool for solving ODEs that allows parameter values modification in run-time (Vensim PLE version 5.11, Ventana Systems, <http://www.vensim.com/software.html>). This program contains a fourth order Runge Kutta method (RK4) to solve ODE systems. The 31-cell full model was implemented using MATLAB and solved with the integrator ode45.

**Complete list of model equations and general descriptions**

Each of the 13 differential equations of the reaction-diffusion type describes the behavior of one system variable (gene transcription and protein production) in a row of 31 cells with a symmetrical distribution of cells centered on the morphogen source (five middle cells). Equation 1 describes the classical evolution of a morphogen (Hh) gradient with production and diffusion terms. In this model, the level of complexity was increased by adding a negative regulation, as formation of Ptc/Hh complexes reduces dynamically the concentration of free Hh. The production term is limited to the *hh*-expressing cells, as expressed in Eqn 14.

Following von Dassow et al. (von Dassow et al., 2000), all other equations distinguish between mRNA transcription and translation. Transcription is described using linear terms of production and degradation. Transcriptional regulation is described using non-linear terms, either positive or negative, in the form of compound Hill equations. The specific form of these type of terms is  $\phi(X\psi(Y, k_2, n_2), k_1, n_1)$ , where  $\phi(X, k, n) = X^n / (k^n + X^n)$  and  $\psi(Y, k, n) = 1 - Y^n / (k^n + Y^n)$ . The ocellar model contains autoregulations. In these cases, the equation term is described as a simple sigmoid in the form  $\phi(X, k, n)$  (see supplementary material Appendix S1 for further details). For each species, the equation takes specific forms, depending on its specific regulatory relationships (for example, with or without autoregulation term).

The model contains different parameter types:  $\alpha_x$  for the basal transcription rates,  $\beta_x$  for the degradation rates,  $k_x$  for the Hill equation transcriptional regulators,  $n_x$  for the Hill coefficients,  $\theta_x$  for the translation rates and  $\gamma_x$  for protein complex formation. The non-dimensional parameters  $k_0$ ,  $k_{Ci}$ ,  $k_{En}$  and  $k_{Ciptc}$  are used for changing the scale of different terms and  $D$  is the diffusion coefficient. Subscript X-Y, with X and Y system variables, indicates regulation from X to Y. For example,  $k_{En-ptc}$  is the Hill transcriptional regulation parameter of the interaction from En to ptc. All the reaction-diffusion equations contain a degradation term.

$$\frac{\partial Hh}{\partial t} = D \frac{\partial^2 Hh}{\partial x^2} + \delta(x) \alpha_{hh} - \gamma_{Ptc-Hh} Ptc \cdot Hh - \beta_{Hh} Hh \quad (1)$$

$$\frac{\partial ptc}{\partial t} = \kappa_0 \beta_{ptc} \left\{ \frac{\alpha_{ptc} + \kappa_{Ciptc} \left( \frac{C_{IA}^{RC_{IA}} \left( 1 - \frac{C_{IR}^{RC_{IR}}}{k_{CIR}^{RC_{IR}} + C_{IR}^{RC_{IR}}} \right)^{RC_{IA}}}{k_{C_{IA}}^{RC_{IA}} + C_{IA}^{RC_{IA}} \left( 1 - \frac{C_{IR}^{RC_{IR}}}{k_{C_{IR}}^{RC_{IR}} + C_{IR}^{RC_{IR}}} \right)^{RC_{IA}}} \right)}{\left( 1 - \frac{En^{n_{En-ptc}}}{k_{En-ptc}^{n_{En-ptc}} + En^{n_{En-ptc}}} \right) - ptc} \right\} \quad (2)$$

$$\frac{\partial Ptc}{\partial t} = \theta_{ptc} ptc - \gamma_{Ptc-Hh} Ptc \cdot Hh - \beta_{Ptc} Ptc \quad (3)$$

$$\frac{\partial PtcHh}{\partial t} = \gamma_{Ptc-Hh} Ptc \cdot Hh - \beta_{PtcHh} PtcHh \quad (4)$$

$$\frac{\partial ci}{\partial t} = \kappa_0 \beta_{ci} \left\{ \frac{\alpha_{ci} \left( 1 - \frac{En^{n_{En-ci}}}{k_{En-ci}^{n_{En-ci}} + En^{n_{En-ci}}} \right)^{RC_{CI}}}{k_{ci}^{n_{ci}} + \left( 1 - \frac{En^{n_{En-ci}}}{k_{En-ci}^{n_{En-ci}} + En^{n_{En-ci}}} \right)^{RC_{CI}}} - ci \right\} \quad (5)$$

$$\frac{\partial C_{IA}}{\partial t} = \kappa_0 \beta_{C_{IA}} \left( \theta_{ci} ci - C_{IA} \right) - \kappa_{CI} \frac{C_{IA}^{RC_{IA}} + C_{IA}^{RC_{IA}}}{k_{C_{IA}}^{RC_{IA}} + C_{IA}^{RC_{IA}}} \left( 1 - \frac{\left( \frac{PtcHh}{Ptc} \right)^{n_{PH}}}{k_{PH}^{n_{PH}} + \left( \frac{PtcHh}{Ptc} \right)^{n_{PH}}} \right)^{RC_{IA}} \quad (6)$$

$$\frac{\partial C_{IR}}{\partial t} = \kappa_{CI} \frac{C_{IA}^{RC_{IA}} + C_{IA}^{RC_{IA}}}{k_{C_{IA}}^{RC_{IA}} + C_{IA}^{RC_{IA}}} \left( 1 - \frac{\left( \frac{PtcHh}{Ptc} \right)^{n_{PH}}}{k_{PH}^{n_{PH}} + \left( \frac{PtcHh}{Ptc} \right)^{n_{PH}}} \right)^{RC_{IA}} - \kappa_0 \beta_{C_{IR}} C_{IR} \quad (7)$$

$$\frac{\partial en}{\partial t} = \kappa_0 \beta_{en} \left\{ \frac{C_{IA}^{RC_{IA}} \left( 1 - \frac{C_{IR}^{RC_{IR}}}{k_{C_{IR}}^{RC_{IR}} + C_{IR}^{RC_{IR}}} \right)^{RC_{IA}}}{k_{C_{IA}}^{RC_{IA}} + C_{IA}^{RC_{IA}} \left( 1 - \frac{C_{IR}^{RC_{IR}}}{k_{C_{IR}}^{RC_{IR}} + C_{IR}^{RC_{IR}}} \right)^{RC_{IA}}} + \kappa_{En} \frac{En^{n_{En}}}{k_{DIEEn}^{n_{En}} + En^{n_{En}}} - en \right\} \quad (8)$$

$$\frac{\partial En}{\partial t} = \theta_{en} en - \beta_{En} En \quad (9)$$

$$\frac{\partial eya}{\partial t} = \kappa_0 \beta_{eya} \left\{ \frac{\alpha_{Toy} C_{IA}^{RC_{IA}} \left( 1 - \frac{Hth^{n_{Hth}}}{k_{Hth-eya}^{n_{Hth}} + Hth^{n_{Hth}}} \right)^{RC_{IA}}}{k_{C_{IA}eya}^{RC_{IA}} + C_{IA}^{RC_{IA}} \left( 1 - \frac{Hth^{n_{Hth}}}{k_{Hth-eya}^{n_{Hth}} + Hth^{n_{Hth}}} \right)^{RC_{IA}}} + \frac{Eya^{n_{Eya}}}{k_{Eya}^{n_{Eya}} + Eya^{n_{Eya}}} - eya \right\} \quad (10)$$

$$\frac{\partial Eya}{\partial t} = \theta_{eya} eya - \beta_{Eya} Eya \quad (11)$$

$$\frac{\partial hth}{\partial t} = \kappa_0 \beta_{hth} \left\{ \frac{\alpha_{hth} + \alpha_{wg} \left( 1 - \frac{Eya^{n_{Eya}}}{k_{Eya-hth}^{n_{Eya}} + Eya^{n_{Eya}}} \right)^{n_{wg}}}{k_{wg}^{n_{wg}} + \left( 1 - \frac{Eya^{n_{Eya}}}{k_{Eya-hth}^{n_{Eya}} + Eya^{n_{Eya}}} \right)^{n_{wg}}} - hth \right\} \quad (12)$$

$$\frac{\partial Hth}{\partial t} = \theta_{hth} hth - \beta_{Hth} Hth \quad (13)$$

$$\delta(x) = \begin{cases} 1 & \text{if } x \in \text{hh-expressing cells} \\ 0 & \text{if } x \notin \text{hh-expressing cells} \end{cases} \quad (14)$$

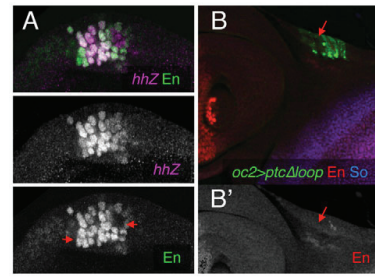
## RESULTS

### Hh signaling and eyes absent expression are dynamic during ocellar patterning

In order to understand how the ocellar pattern (Fig. 1C) was generated, we analyzed the expression of *ptc* (a Hh signaling readout) and *eyes absent* (*eya*) (a Hh target) in the prospective ocellar region throughout L3. To monitor Ptc expression, we used a GFP:Ptc protein trap line. In early L3 discs, we detected a single domain of GFP:Ptc expression and uniformly low levels of Eya (Fig. 1D). By mid-L3, levels of Eya rise within the GFP:Ptc-expressing region, also as a single domain (Fig. 1E). From mid to late-L3, the final pattern arises through the repression of Ptc/Eya expression in the prospective interocellar cuticle (Fig. 1F). This pattern suggests the existence of a repressor capable of attenuating the *hh* pathway in the middle of the ocellar field [see also Brockmann et al. (Brockmann et al., 2011)] and whose expression and/or activity should build up during L3.

### engrailed is activated by Hh and attenuates its signaling pathway to establish the ocellar pattern

*engrailed* (*en*) is a candidate *hh* repressor. It encodes a homeodomain transcription factor with an additional transcriptional repressor domain (Jaynes and O'Farrell, 1991). *En* is known to repress transcription of two major *hh* signaling components, *ptc* and *ci*, in embryos and wing imaginal discs (Eaton and Kornberg, 1990; Hidalgo and Ingham, 1990; Sanicola et al., 1995; Schwartz et al., 1995; Domínguez et al., 1996; Biehs et al., 2010). In the wing, *hh* expression in its posterior compartment depends on *en*. However, *hh* signaling from the posterior compartment induces *en* expression in anterior cells at a short range. Therefore, *en* is a low sensitivity *hh* target in the anterior wing (Guillen et al., 1995; Ohlmeyer and Kalderon, 1998; Méthot and Basler, 1999). In the ocellar region, *hh* expression precedes that of *en*, which is expressed in a *hh*-like pattern in late L3 (Royet and Finkelstein, 1996). These results suggest that *en* could be a *hh* target in the ocellar region. To test this point, we first checked the relative expression of *hh*, using the *hh-Z* strain as a *hh* transcriptional reporter, and of *en*. Their domains almost completely overlapped, with some *En*-only cells adjacent to the *hh-Z* domain (Fig. 2A). Second, when we knocked down the *hh* signaling pathway in *oc2 > GFP-PtcAloop2* discs, *en* expression was lost. The expression of *so*, which follows that of *eya*, was also lost from the ocellar region, confirming the effectiveness of the knock-down (Fig. 2B). This result indicated that *en* is a *hh* pathway target

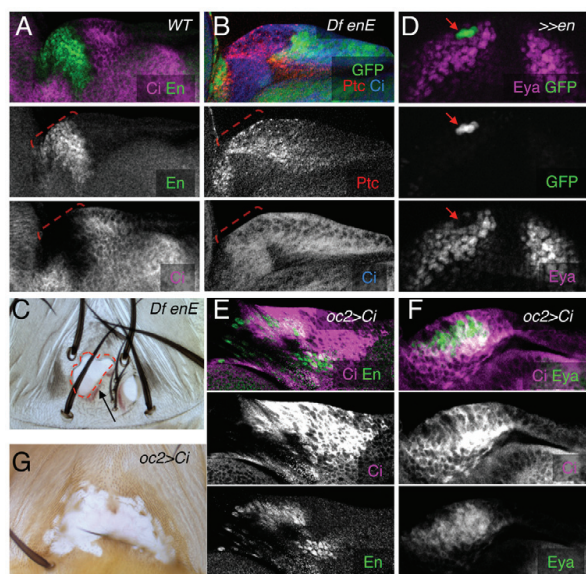


**Fig. 2. *en* is a *hh*-signaling target.** (A-B') Ocellar fields of late-L3 larvae. (A) *hh-Z* larva stained for β-galactosidase ('*hh-Z*') and anti-*En*. Individual channels are shown. The red arrows indicate nuclei expressing *En*, but not β-galactosidase. (B, B') *oc2>ptcAloop2-GFP* larva, stained for *En* and *So*. The expression of *ptcAloop2* is detected in the ocellar field as the GFP-positive patch (arrows). In this region, the *En* expression is almost totally absent. The *En* channel is shown separately (B'). In this genotype, *So* expression is also lost, indicating that the *hh*-signaling knock down induced by overexpression of *ptcAloop2* is effective.

in the ocellar region. To test for *en* function, we carried out three experiments. First, we verified the status of the *hh* signaling pathway in the *en*-expressing cells by examining *ci* expression. In the *en* domain, *ci* is repressed (Fig. 3A), a fact that is consistent with the repressor role of *en* in other developmental contexts. Second, to test directly this repressing role, we induced marked clones of cells homozygous for the *Df(2R)enE*. This deficiency removes both *en* and its paralog *invected* (*inv*), thus avoiding potential functional redundancy between both genes. In *Df(2R)enE* clones spanning the ocellar field the expression of Ptc and *Ci* is now continuous, lacking the characteristic gap in the prospective interocellar region (Fig. 3B). In adult mosaics, the anterior and posterior ocelli are often fused (Fig. 3C). The fact that the area of the fused ocelli is larger than the sum of the wild-type anterior and posterior ones suggests that the increase in ocellar surface is at the expense of interocellar cuticle. And third, we checked the effects of *en* overexpression on the *hh* target *eya*. In GFP-marked *en*-expressing clones, *eya* is repressed in a cell-autonomous manner (Fig. 3D). This *eya* loss could be explained either by *en* directly repressing *eya* or, indirectly, by *en* blocking the *hh* pathway. To distinguish between these two possibilities, we overexpressed *ci* throughout the ocellar field in *oc2>ci* larvae, therefore making *ci* transcription insensitive to *en* regulation. In these larvae, the expression of both *eya* and *en* is detected in most of the ocellar field (Fig. 3E,F). Therefore, *Ci* can activate *eya* even in the presence of *en*. In *oc2>ci* adults, the resulting ocellar complex is composed of a large, single ocellus, without interocellar cuticle (Fig. 3G). This indicates that *eya* is functionally epistatic over *en*, and suggests that the primary role of *en* is as a *hh* pathway regulator. In all, these results indicate that high concentrations of Hh result in high *en* expression, which in turn attenuates *hh* signaling in the middle of the ocellar field. As a consequence, RD expression and ocellar specification can only occur in regions that flank the *en* domain, which becomes the interocellar domain.

**Delta/Notch signaling is required for *en* maintenance and interocellar region specification**  
*en* lays both downstream and upstream of the Hh signaling pathway, being activated by Hh and also repressing the pathway



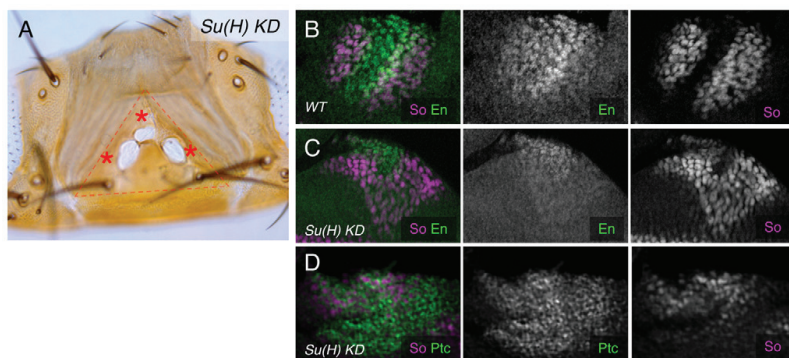


**Fig. 3. *en* is a repressor of the *hh* pathway that is required for the interocellar region.** (A,B,D-F) Ocellar fields of late-L3 larvae and (C,G) adult ocellar regions. (A) Wild-type ocellar field stained for En and Ci. The expression patterns of En and Ci are mutually exclusive. (B) A *Df enE* clone spanning the ocellar region. Within the mutant tissue (marked by the absence of GFP), Ptc and Ci are now expressed. The broken lines in A,B mark the approximate span of the En domain in a wild-type disc. (C) Ocellar region of an adult containing unmarked *Df enE* clones. A single ocellus extends over the whole left region (arrow). (D) Small *en*-expressing clone (>>en), marked with GFP, represses Eya cell-autonomously (arrows). (E,F) Ocellar fields from *oc2>ci* larvae express high levels of Ci (magenta). Both En (E) and Eya (F) are expressed in a single domain. In all immunofluorescence images, merged and separate channels are shown. (G) Ocellar region of a *oc2>ci* adult showing the enlargement of the ocelli and absence of interocellar cuticle. The fact that in this genotype both *en* and RD genes, such as *eya*, are expressed indicates that RD genes are functionally epistatic over *en*.

components *ci* and *ptc*. Therefore, these genetic relationships should lead to an unstable *en* expression (indeed, this conjecture was confirmed by our mathematical modeling, see below). Therefore, after its induction by *hh* signaling, an additional mechanism was required to stably maintain high levels of *en* expression in a *hh*-independent manner. It had been reported that in individuals mutant for a *Notch* temperature-sensitive (*N<sup>ts</sup>*) allele, raised at the restrictive temperature during late larval life, the ocelli fuse (Amin, 2004), generating a ‘cyclopic’ ocellus similar to that observed in *Df(2R)enE* mosaics. To confirm the involvement of *Notch* signaling in ocellar development, we genetically manipulated several *Notch* pathway components. Ocellar-specific knock-downs of the nuclear transducer *Su(H)* [*Su(H)KD*] and the *Dl* ligand (*Dl KD*), or the overexpression of a dominant-negative

form of *mastermind* (*mamDN*), a *Notch* co-activator, resulted in expanded or fused ocelli (Fig. 4A; and not shown). Interestingly, similar knock down of the other *Notch* ligand, *Ser*, does not affect ocellar complex development (not shown). The similarity between the *Notch* pathway mutant phenotypes and the loss of *en* pointed to *Notch* signaling being required for *en* expression. Indeed, in *Su(H)KD* discs, the *en* domain is reduced in size and expression intensity and, concomitantly, the two RD domains extend, contacting each other (Fig. 4B,C).

In principle, the input of *Dl/Notch* in the network could be upstream of *hh* (maintaining its expression or signaling) or parallel to *hh*. However, the incomplete activation of *en* should persist in the former scenario. When we checked the signaling status of the *hh* pathway in *Su(H)KD* discs by analyzing *ptc* expression, we



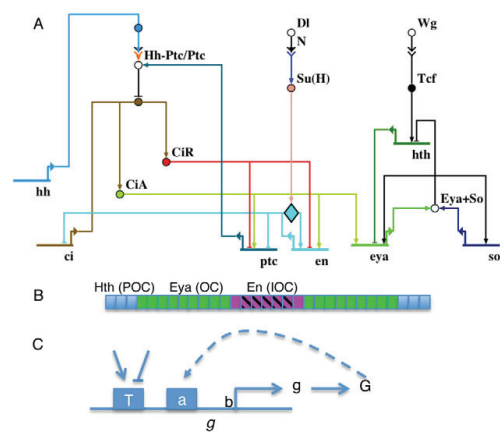
**Fig. 4. *Notch* signaling is required for *en* expression and the specification of the interocellar region.** (A) Adult dorsal head and (B-D) late-L3 ocellar fields. (A) A *oc2>Su(H) RNAi* [*Su(H)KD*] individual, showing enlarged ocelli (asterisks) at the expense of the interocellar region. No interocellar bristles remain. The ocellar complex region is marked by the triangle. (B) Wild-type expression of *en* and *so*. (C) In *Su(H)KD* discs, the *en* expression domain is weaker and smaller, whereas the *so* domains extend and fuse into a single domain. (D) In this genotype, the *hh* signaling pathway is not compromised, as strong Ptc signal is detected throughout the prospective ocellar field.

detected an unsplit domain of strong Ptc signal, indicative of sustained *hh* production and signaling when the activity of the *Notch* pathway is reduced (Fig. 4D). In addition, the fact that knocking down the *Notch* pathway still allowed specification of ocelli, which is a *hh*-controlled fate, agrees with *DI/Notch* acting parallel to, or downstream of, *hh*.

To determine the developmental window in which *Notch* signaling was required for the maintenance of *en*, we performed the following experiment. *DI* expression was knocked down at different times during third instar, taking advantage of the temperature sensitivity of the GAL4/UAS system (supplementary material Fig. S1; see also Materials and methods), and the size of the interocellar cuticle in adults was analyzed, the fate of which depends on stable and high levels of *en* expression. Interocellar cuticle surface was estimated by the number of interocellar bristles formed (from 0 in its absence, to 6-8 in the wild type). Disconnecting *DI/Notch* signaling using a *UAS-DI-RNAi* (*oc2>DI-RNAi* or '*DI KD*') prior to 80 hours post fertilization (hpf) results in almost total absence of interocellar cuticle. *DI KD* during the 80-85 hpf interval results in intermediate phenotypes with incomplete and variable interocellar regions (supplementary material Fig. S1). Interestingly, this developmental window coincides with the establishment of a strong domain of *en* expression and the split of the *eya/so* domain in the disc (not shown). Knocking down *DI* after 85 hpf no longer precludes the generation of the interocellar cuticle. This result shows that *Notch* signaling activity is required to establish the interocellar fate during a short developmental interval (coinciding with upregulation of *en* in the ocellar field), after which, it remains stable. As the interocellar fate depends on *en*, we interpret this result as *en* expression becoming fixed by *Notch* during the 80-85 hour interval.

### A mathematical model for the Hh-driven ocellar patterning

In order to test whether our genetic reasoning was capable of generating the ocellar pattern, we developed a mathematical model incorporating all known genetic interactions (Fig. 5A). Several simplifications were made. First, the two-dimensional ocellar region is modeled as one dimensional (i.e. Fig. 5B, as a row of 31 cells). Second, the *hh* transcription domain (the central five cells) is set as a de facto in our model. Third, our model assumes that there is no proliferation during the developmental interval considered (see supplementary material Appendix S1). Hh production and diffusion have been modeled as in Eqn 1 (see Materials and methods), similar to the formalism used by Nahmad and Stathopoulos to model Hh gradient formation in the wing primordium, considering a diffusion coefficient of  $D=0.5\mu\text{m}^2/\text{s}$  (Nahmad and Stathopoulos, 2009). Downstream of the Hh gradient, transcription and translation of all genes have been modeled using ordinary differential equations (ODEs), essentially following the modeling of the *Drosophila* embryonic segment polarity network by von Dassow and colleagues (von Dassow et al., 2000). Gene transcription may generally be affected by basal (b) and regulated transcription (T), and autoregulation (a), plus a decay term (Fig. 5C). Autoregulation is relevant only for *en* and *eya*. Transcriptional regulation terms have been modeled as sigmoids, allowing for potential cooperativity in transcriptional activation and repression. The general form of the transcription and translation equations, as well as the full set of equations are described in Materials and methods. In what follows, we explain how the new regulatory steps have been modeled. Further details on the specific biology underlying other equations (Eqns 2-7) are



**Fig. 5. Regulatory network and one-dimensional model.**

(A) Biotapestry 'view from the genome' of the gene network. (B) One-dimensional lattice of 31 cells. *hh* is transcribed in the middle five cells (stripes). The target patterns for *Eya* (green), *En* (purple) and *Hth* (blue) are represented. These patterns correspond to the prospective ocellar (OC), interocellar (IOC) and pericellular (POC) regions. (C) Generic gene (*g*) model. Transcript (*g*) and protein product (*G*) are indicated. The rate of transcription is dictated by basal transcription rate ('b'), regulated transcription, both positive and negative ('T'), and autoregulation ('a'). Decay rates applying to *g* and *G* and have not been represented.

described in supplementary material Appendix S1. We have shown that *DI/Notch* signaling is required for maintaining high *En* levels in the interocellar region. We have modeled *en* maintenance as an autoregulation (Eqn 8), as *en* has been shown to autoregulate during embryo segmentation (Heemskerk et al., 1991). The contribution of *DI/Notch* signaling would be to facilitate the autoregulation of *en* by lowering *k* in the autoregulatory term (which indicates the *En* concentration for which half autoregulatory activation is reached). Because of this, it has been named  $k_{DIEn}$ . This implementation is the simplest form of representing the role of *DI/Notch* in allowing *en* autoregulation we could think of. It considers a constant and uniform *DI/Notch* input and that the *hh* and *Notch* pathway act independently of one another. The *en* autoregulation adds on top of a positive Hh signaling input on *en* transcription (Eqn 8). The expression of *eya* has been shown to depend only on *CiA* (Blanco et al., 2009), so no *CiR* input on *eya* regulation has been included. In addition, the *eya-so* positive-feedback loop (Pauli et al., 2005; Brockmann et al., 2011) has been collapsed into a direct *eya* autoregulation for simplicity (Eqn 10). In addition, previous results had suggested a mutual repression between *hth* and *eya* (Brockmann et al., 2011), which is probably direct (supplementary material Fig. S2). Therefore, *hth* has been modeled as a repressor input on *eya* (Eqn 10). In addition, *hth* transcription is modeled as being positively regulated by a constant term ( $\alpha_{wg}$ ) (Eqn 12), which represents the likely action of *Wnt1/wingless* (*wg*) (Azpiazu and Morata, 2000; Casares and Mann, 2000; Pichaud and Casares, 2000).

The working model has 61 free parameters. For a few, prior biological knowledge is helpful in defining at least some ranges. For example, the basal transcription rates of *ptc* and *ci* are positive, as these genes are widely transcribed. In order to generate a working set of parameter values that result in the target 'wild-type'



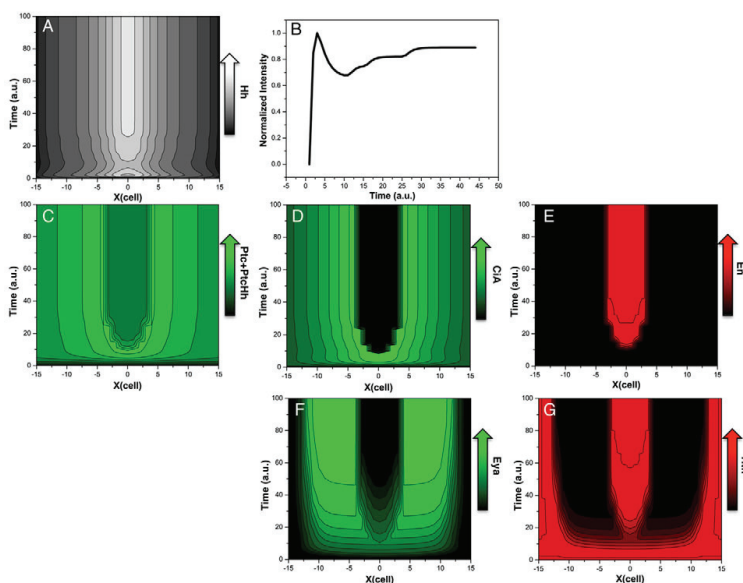
pattern (Fig. 5B, seven interocellar and two patches of nine ocellar cells in a 31 row), we first built a one-cell model in which to carry out the first parameter exploration. Then, this parameter set was used as a starting point to manually fine-tune the parameter values on the full model to reach a control pattern (see Materials and methods for further details). With this set of parameter values (supplementary material Table S1), the model accurately recapitulates the target pattern, including the dynamics of Eya, Ptc, CiA, En and Hth expression (Fig. 6; supplementary material Fig. S3). Modeling indicates that before reaching a steady state, the Hh gradient undergoes a transient expansion or ‘overshoot’ (Fig. 6A,B). This early dynamics depends on the non-linear Ptc-mediated feedback (Casali and Struhl, 2004; Nahmad and Stathopoulos, 2009). The model also predicts observed mutant behaviors, including the expansion of the ocellar tissue at the expense of interocellar cuticle in *Dl* and *en* loss-of-function mutants, or the effects of *hth* on ocellar size (supplementary material Fig. S4). Another computational experiment, the overexpression of *Dl*, predicted the expansion of the interocellar region at the expense of the ocelli. When this prediction was tested experimentally, by overexpressing *Dl* in the developing ocellar region (*oc2>Dl*), the interocellar region enlarged and the anterior ocellus disappeared (supplementary material Fig. S4).

### The model GRN is robust against variations in initial conditions and noise

An important test for any systems behavior is the stability of its solution and whether this solution is unique or not. To test this point, the initial condition of every system variable was randomized (up to a 10-fold change) in each individual cell (supplementary material Table S2). The solution obtained for the system is stable, as the resulting patterns are the same as the wild type (supplementary material Fig. S5A). Only when the initial condition for En exceeds the concentration determined by the parameter  $k_{DIEr}$ , which is responsible for En autoregulation ( $k_{DIEr} > 0.2$ ), is *en* expression fixed throughout, which precludes the

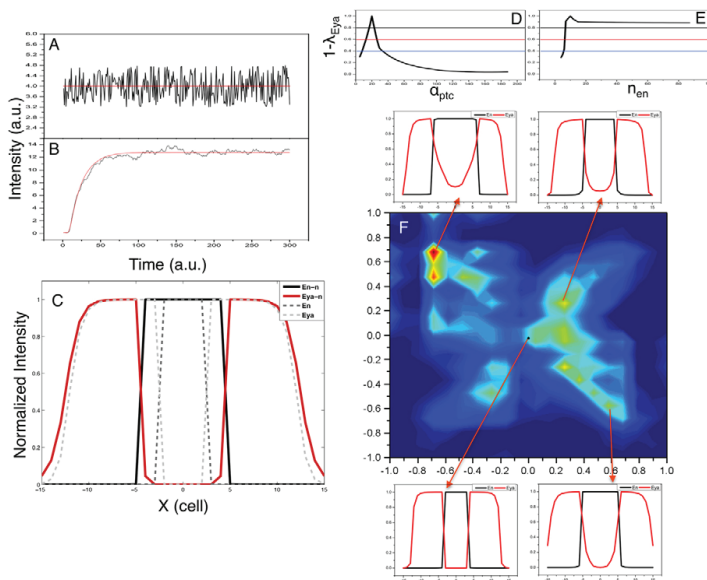
establishment of the *eya* pattern, as expected (supplementary material Fig. 5B,C). In fact, En expression is not detected in the ocellar region until mid-L3, after Eya expression has increased uniformly in the ocellar region (not shown).

Next, and to test whether the network topology is robust to fluctuations, we perturbed all parameters related with production and degradation rates ( $\alpha_X, \theta_X, \beta_X$ ) with a uniform random signal (white noise). The noise amplitude was 20% for each corresponding rate (Fig. 7A). This fluctuation alters the evolution of the network elements as shown in the Eya time series of Fig. 7B. Under these conditions, the system reproduces the ocellar pattern with a slight deviation (widening) of the interocellar region. This experiment shows that indeed the network model is robust. To further test the robustness of the biological system, we subjected several *Drosophila* strains to temperature fluctuations during early L3, as a means to increase the noise in the system (Li et al., 2009). We included two reference strains as controls (the wild-type strain Oregon-R and *w<sup>1118</sup>*) and stocks in which the gene dose of *smo*, *ptc*, *ci* and *Notch* is halved (see Materials and methods), and measured the longer axes of the anterior and posterior ocelli and the interocellar distance. These different genotypes can be thought of as representing the same gene network in which the parameter values may have different, genotype-specific, values. First, we found that different strains showed differences in ocellar and interocellar sizes, indicating that the genotype has a significant influence in the precise size and proportions within the ocellar complex (supplementary material Fig. S6). Second, and directly related to the aim of the experiment, we found that for some genotypes, the temperature fluctuation regime results in size deviations from the control. However, these deviations are smaller than the differences between genotypes. For example, while the difference in ocellar size between *w<sup>1118</sup>* and *Notch-/+* (at 25°C) is about 12%, the temperature fluctuations alter ocellar size in *Notch-/+* by only 5%. Furthermore, the external noise introduced did not result in a significantly ‘noisier’ phenotype, measured as the coefficient of variation of ocellar and interocellar sizes



**Fig. 6. Spatiotemporal dynamics of the Hh gradient and observed model variables.** (A) Surface contour plot showing the Hh gradient dynamics. (B) Temporal variation of Hh concentration (normalized intensity) in cell 5. The magnitude of the Hh gradient varies with time, with an early ‘overshoot’, followed by a retraction to then reaching steady state. (C-G) Surface contour plots for the wild-type set of parameters depicting the dynamics of the variables that have been experimentally analyzed: total Ptc (Ptc+Ptc:Hh, C), CiA (D), En (E), Eya (F) and Hth (G). With this parameter set, the model correctly predicts qualitatively the biological pattern. (a.u.: arbitrary units). Cell number is represented on the x axis.





**Fig. 7. Analysis of the robustness of the model against noise and parameter variations.** (A) Application of a white noise distribution of 20% amplitude to  $\theta_{en}$  as an example of noise implementation. (B) Eya time series with- and without-noise rates, shown in black and red. (C) Eya (red) and En (black) patterns when applying noise (continuous) or without noise (discontinuous). Rates with noise result in slightly broader intercellular region. (D,E) Examples of complementary distance when varying each parameter at a time over a range of two orders of magnitude. (D)  $\alpha_{ptc}$  presents narrow ranges for ‘good’, ‘medium’ and ‘bad’ patterns [thresholds black (>0.8), red (0.6-0.8) and blue (0.4-0.6), respectively], while (E)  $\eta_{en}$  remains in the ‘good’ range in most of the studied range. (F) Density plot of 10,000 points in the 13-dimensional space corresponding to the distances of the 13 variable patterns to the wild type (black dot, situated at point 0,0). Some Eya and En patterns are also shown corresponding to the wild-type condition (bottom-left diagram) and three additional cases extracted from dense clusters located at different distances from the control.

(supplementary material Fig. S6). Therefore, the ocellar complex is robust against noise, as the model predicts. In addition, different genotypes, equivalent to the same gene network with a (presumably slightly) different set of parameter values, give rise to ocellar patterns that are also quantitatively different, even if these differences are small. The next section explores the properties of the model across the parameter space.

### Exploration of parameter space suggests that the network imposes constraints on phenotypic variation

Next, we carried a parameter sensitivity assay. First, and starting with our working parameter set, we varied one parameter at a time in a two orders of magnitude range around its wild-type value, and measured the departure this variation caused from the wild-type pattern. As a metric for this deviation, we calculated a goodness score as a distance ( $\lambda$ ) between the wild-type Eya pattern and that obtained from the varied parameter run, both normalized (see supplementary material Appendix S1). We established three thresholds for the complementarity of this distance ( $1-\lambda$ ):  $1-\lambda \geq 0.8$  (‘good’),  $0.8 > 1-\lambda \geq 0.6$  (‘medium’) and  $0.6 > 1-\lambda \geq 0.4$  (‘bad’), with  $1-\lambda \geq 0.8$  being the most accurate fits (Fig. 7D,E; supplementary material Table S1). Twenty-eight out of 61 parameters gave goodness values above 0.8 over several orders of magnitude and were classified as ‘insensitive’ (i.e. large variations in their value did not result in major deviations from the target pattern) (Fig. 7E; supplementary material Fig. S9.1-9.4; supplementary material Table S1). The remaining ones (33) were sensitive (Fig. 7D), although the range of values for each specific parameter that resulted in a score of at least 0.8 varied among them (see supplementary material Table S1). The most sensitive parameter is the basal transcription rate constant  $\alpha_{en}$ , which is also the parameter that does not allow variation in the noise experiments. This suggests that *en* expression has to be kept strictly off in the absence of patterned Hh signal. Not surprisingly, other sensitive parameters are those related to *ptc*

and *ci* expression, which affect the major feedbacks in the network (supplementary material Table S1).

Second, we carried out an analysis in which all 33 sensitive parameters were simultaneously randomized at each run inside one of the goodness intervals (the remaining parameters were left fixed at their wild-type values). A total of 10,000 runs were obtained, distributed among ‘good’ (6000), ‘medium’ (3000) and ‘bad’ (1000) randomized parameter values. For all 10,000 parameter sets, the distance for all the patterns of the system (one per variable) to the wild type was calculated. In this way, each parameter set defines a point in a 13-dimensional space, each dimension being one of the model variables (see supplementary material Appendix S1). For visualization, this information was reduced to three dimensions, two of them being the projections of the distance distributions two by two, and another representing the density of multidimensional points in such projections. The resulting 2D histogram (Fig. 7F; supplementary material Fig. S7) plots the density of patterns from the 10,000 randomized runs distributed relative to their distance from the wild type (point 0,0) (see supplementary material Appendix S1 for details). Therefore, it represents a map of the phenotypic space generated by the GRN (gene regulatory network) using randomized sets of parameters. Several conclusions can be derived from this analysis. First, the distribution of solutions (patterns) was not evenly dispersed. Instead, the solutions tended to concentrate in clusters or ‘islands’. Second, the wild-type pattern was placed inside a big and dense cluster, so this solution is highly probable, which indicates that the pattern is stable. Finally, when we analyzed the patterns of Eya and En (the two major readouts of the GRN) located in dense islands far apart from the wild type, we found that those patterns were still qualitatively similar to the wild type [Fig. 7F; see, for example, the high stability island around (−0.7,0.7) in supplementary material Fig. S7B]. This is interesting, because in this experiment we used parameter values coming not only from the ‘good’ interval, but also from ‘medium’ and ‘bad’ ones, as derived from our previous single parameter analysis. In summary, these analyses indicate that the



GRN is robust, because wide and random parameter variation results in specific phenotypic clusters, all of them similar to the wild type.

## DISCUSSION

Many gene networks are described as static regulatory (activating and inhibitory) relationships between network components (genes and their products), disregarding essential dynamic and spatial aspects. In such descriptions, all genetic interactions are given as though happening at once and without spatial context. Mathematical modeling allows us to test the logic consistency of such networks, and whether or not they are capable of explaining the spatial and temporal dynamics of the biological system.

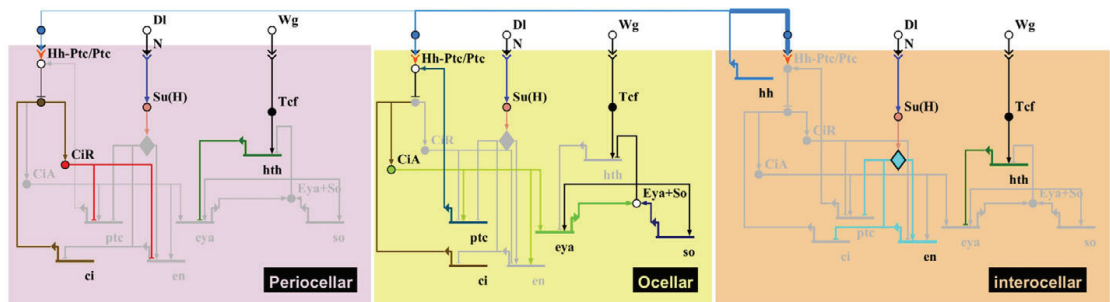
Using an integration of experimentation and mathematical network modeling, our results help to explain how several alternative fates are controlled by the Hh morphogen (Fig. 8). Previous descriptions of the genetic interactions involved in the specification and patterning of the ocellar complex structures did not offer satisfactory explanations for this fate choice decision.

A first important point is the addition to the GRN of *en* as a *hh* target with self-maintaining capability. The transduction of the Hh gradient generates an initial asymmetry, with only the cells receiving the highest Hh concentrations being able to maintain *en* expression. This in turn sets in motion the dynamics of the GRN. The evolution of some key system components is shown in Fig. 8.

A second important point is the action of *en* as a Hh-pathway repressor. The fact that *en* expression is sustained just in cells receiving the highest Hh concentrations (the Hh-producing cells and their adjacent neighbors) makes these cells read the Hh signal only transiently, as the signaling pathway is blocked as *en* expression builds up. This means that it would be impossible for

*en* to reach sufficient expression levels to shut off the pathway – and therefore, to inactivate *eya* – unless additional mechanisms were considered. In fact, the inactivation of *eya* is necessary for the specification of the interocular region: thus, uniform and high *ci* expression results in the co-expression of *eya* and *en* throughout the ocellar field. In this situation, *eya* is functionally epistatic over *en*, and the only tissue type specified is ocellus. Therefore, a stable interocular region can be established only if the initiation of *en* expression is followed by a *hh* signaling-independent phase. Such a transition from signal-induced expression to independent mode of maintenance has been reported for *en* during *Drosophila* embryonic segmentation (Heemskerk et al., 1991). In the ocellar field, we propose that this transition requires *Notch* signaling, specifically activated by its ligand *Dl* (but not by *Ser*). The molecular mechanisms of this *en* maintenance are not yet clear, but might involve PREs (polycomb response elements) in the *en* locus (Kwon et al., 2009).

Our model includes another repressor, *hth*, which enters the network as a direct repressor of RD. Its contribution seems limited to restricting the external extent of the *eya/so* expression domain. In *hthKD* animals, the ocelli are larger, but the interocular cuticle is still present. In our model, *en* repressive action suffices to turn off *hh* signaling pathway, thereby precluding RD activation. We have tested, through modeling, the possibility of *hth* being required for *en* activity, as it has been shown to be the case during embryonic segmentation (Kobayashi et al., 2003). In this case, though, making the repression function of *en* dependent on *hth* does not allow the network to reach any steady state in which the interocular domain is established – i.e. *en* does not reach the maintenance threshold. To verify this prediction, we checked *en* expression and the activity status of the *hh* pathway in *hthKD* discs. As predicted, *en* is expressed at normal levels in a domain where *ci* is off, as in wild type (supplementary material Fig. S8).



**Fig. 8. Logic of the ocellar complex GRN.** A Biotapestry representation of the ocellar complex (OC) GRN architecture. Genes are represented by horizontal lines topped by a bent arrow (the transcriptional start site, TSS). Positive and negative interactions (lines emerging from the TSS) are represented by arrows or capped lines, respectively. Protein-protein interactions are represented by circles. Different cell types are symbolized with colored boxes (named accordingly). Cell signaling is represented by lines reaching from inside one cell type to the outside (thickness indicates strength of the signaling); chevrons and circles are used to represent signal reception and transduction, respectively. White circles outside cell boxes represent signaling ligands. Genes and interactions are represented in color if active, in gray otherwise. Three cell types are specified according to the decreasing level of Hh signal they receive: inter-ocular, ocellar and periocular cells. Hh signal triggers both RD genes (*eya* and *so*) and *en* expression. In interocular cells, high Hh concentrations promote the expression of *en*, which in turn represses RD genes by shutting down *ptc* and *ci* expression, and therefore eliminating Hh signal reception. Inside ocellar cells, *en* expression does not occur because of weaker Hh signaling; this makes RD gene activation possible. Ocellar and interocular cells therefore achieve distinct gene expression patterns. In interocular cells, *en* expression is maintained by the *Dl/Notch* pathway (present throughout the entire OC). This particular interaction is represented with a diamond (within the *en* auto-activation line). RD genes expression domain is also defined through the contribution of *hth*; this gene is likely to be activated downstream of the *wg* pathway. In ocellar cells, *Eya* and *So* (acting as a complex) repress *hth*. Periocular cells lie at the periphery of Hh signaling and RD gene activation is prevented by Hth: this repression contributes to define the size of the ocelli. The periocular region gives rise to the front cuticle in the adult head.

Recently, a similar situation to the one we detailed here has been described during the dorsoventral patterning of the vertebrate neural tube by *Shh* (Ribes et al., 2010). The floor plate (FP), the ventral-most region of the neural tube, expresses *Shh* and requires maximal *Shh* concentrations for its specification (Chiang et al., 1996; Ericson et al., 1996). However, this requirement is transient and followed by an attenuation of the pathway. This attenuation is necessary for FP specification (Ribes et al., 2010). This process of FP specification is reminiscent of the specification of the interocular cuticle in our system. This similarity raises the possibility that a negative-feedback loop in the *Shh* pathway, of the type we have described here, could be part of the neural tube GRN. However, after the initial asymmetry within the ocellar field has been established, an external input, the *Dl/Notch* signal, is needed to maintain it. In our model, there is no need for a localized *Notch* signal: uniform signaling suffices, provided that *en* expression reaches a specific concentration threshold. In fact, using an anti-*Dl* monoclonal antibody, we detect uniform levels of *Dl* expression in the ocellar field in mid-L3 (not shown), the developmental period when we start to see the distinct domains emerging. Interestingly, a recent report finds an association between mutations in *Dl11*, a vertebrate *Dl*-like ligand, and holoprosencephaly (Dupé et al., 2011). Holoprosencephaly, a developmental defect caused by abnormal specification of the ventral midline structures of the anterior neural tube, is frequently associated with malfunction of the *Shh* pathway. In fact, work in vertebrates indicates that *Notch* signaling is indeed required for FP fate acquisition parallel to *Shh* (le Roux et al., 2003; Peyrot et al., 2011). It is therefore tempting to speculate that the *Notch* pathway is required to fix the FP fate in the vertebrate neural tube by stabilizing gene expression during the phase of *Shh* signaling attenuation, as we propose here for *Notch* in the *Drosophila* ocellar GRN.

The model we have described explains how mutually exclusive gene expression domains are produced under the control of a Hh gradient by connecting a repressive gene circuitry. These expression domains underlie the morphology of the structures that will later form and cannot be explained unless the information of Hh gradient is integrated with the logic of the GRN. They can therefore be considered as the emerging properties of the system we have described.

The structure of this GRN confers robustness to the patterning mechanism, buffering variations in the initial conditions, as well as absorbing noise. Although the model predicts an early overshoot of the Hh gradient, this might not be crucial, as variations in the initial conditions converge to the same pattern.

Interestingly, random variation of parameter values results in the system deviating from the ‘wild-type’ pattern in a non-random manner, but instead falling into specific ‘islands’ of the phenotypic space. That is, variations in the control parameters of the GRN generate phenotypes that maintain certain rules of proportionality. Still these phenotypic ‘variants’ are robust against noise, as is the wild-type pattern (supplementary material Fig. S7). These mathematical properties of the ocellar network might ensure the phenotypic stability of the ocellar structures in wild flies exposed to varying environmental conditions during development, as well as constraining the phenotypic variability of the ocelli during evolution.

#### Acknowledgements

We thank I. Guerrero, I. Rebay and R. S. Mann for antibodies; P. Rojas, J. Blanco, C. M. Luque, the Bloomington, VDRC and Flytrap Stock Centers, and the Consolider ‘From Genes to Shape’ *Drosophila* Collection for fly strains; and O. Abreu for help with experiments.

#### Funding

This work was funded by the Spanish Ministry for Science and Innovation (MICINN/MINECO, co-funded by Feder program) [BFU2009-07044], by Proyecto de Excelencia CVI 2658 (Junta de Andalucía) to F.C., by Consolider ‘From Genes to Shape’ (in which F.C. is participant researcher; MICINN/MINECO), and by MICINN/MINECO [FIS2008-04120 to A.C. and M.C.L.].

#### Competing interests statement

The authors declare no competing financial interests.

#### Supplementary material

Supplementary material available online at <http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.082172/-DC1>

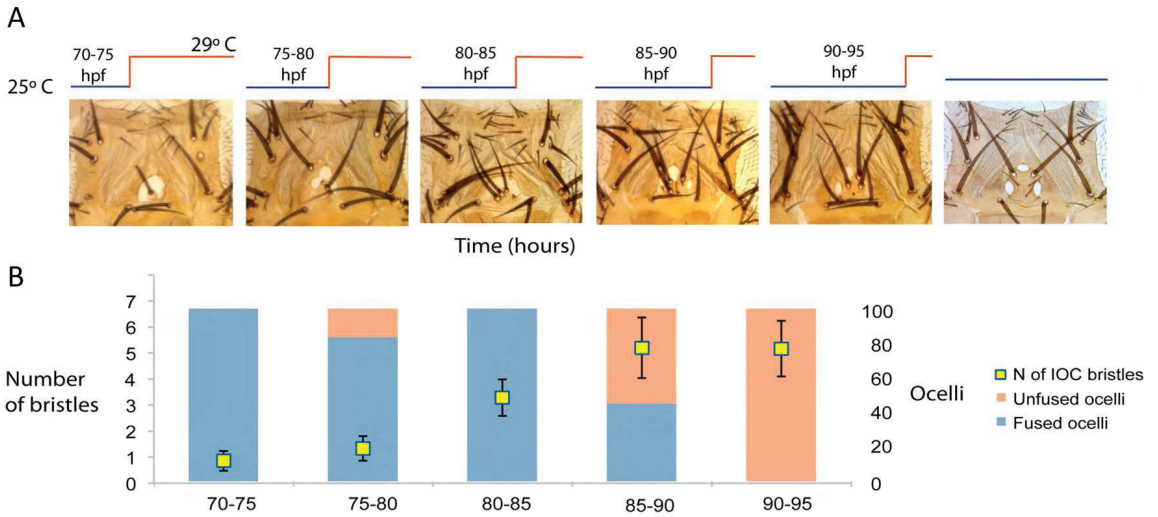
#### References

- Alexandre, C., Jacinto, A. and Ingham, P. W. (1996). Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes Dev.* **10**, 2003-2013.
- Amin, A. (2004). Genetic cross-talk during head development in *Drosophila*. *J. Biomed. Biotechnol.* **2004**, 16-23.
- Aza-Blanc, P., Ramirez-Weber, F. A., Laget, M. P., Schwartz, C. and Kornberg, T. B. (1997). Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* **89**, 1043-1053.
- Azpiaz, N. and Morata, G. (2000). Function and regulation of homothorax in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Development* **127**, 2685-2693.
- Balaskas, N., Ribeiro, A., Panovska, J., Dessaud, E., Sasai, N., Page, K. M., Briscoe, J. and Ribes, V. (2012). Gene regulatory logic for reading the Sonic Hedgehog signaling gradient in the vertebrate neural tube. *Cell* **148**, 273-284.
- Basler, K. and Struhl, G. (1994). Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature* **368**, 208-214.
- Bessa, J. and Casares, F. (2005). Restricted teashirt expression confers eye-specific responsiveness to Dpp and Wg signals during eye specification in *Drosophila*. *Development* **132**, 5011-5020.
- Biehls, B., Kechris, K., Liu, S. and Kornberg, T. B. (2010). Hedgehog targets in the *Drosophila* embryo and the mechanisms that generate tissue-specific outputs of Hedgehog signaling. *Development* **137**, 3887-3898.
- Blanco, J., Seimiya, M., Pauli, T., Reichert, H. and Gehring, W. J. (2009). Wingless and Hedgehog signaling pathways regulate orthodenticle and eyes absent during ocelli development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **329**, 104-115.
- Blanco, J., Pauli, T., Seimiya, M., Udolph, G. and Gehring, W. J. (2010). Genetic interactions of eyes absent, twin of eyesless and orthodenticle regulate sine oculus expression during ocellar development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **344**, 1088-1099.
- Bonini, N. M., Leiserson, W. M. and Benzer, S. (1993). The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell* **72**, 379-395.
- Bonini, N. M., Leiserson, W. M. and Benzer, S. (1998). Multiple roles of the eyes absent gene in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **196**, 42-57.
- Briscoe, J., Chen, Y., Jessell, T. M. and Struhl, G. (2001). A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol. Cell* **7**, 1279-1291.
- Brockmann, A., Dominguez-Cejudo, M. A., Amore, G. and Casares, F. (2011). Regulation of ocellar specification and size by twin of eyesless and homothorax. *Dev. Dyn.* **240**, 75-85.
- Buszczak, M., Paterno, S., Lighthouse, D., Bachman, J., Planck, J., Owen, S., Skora, A. D., Nystul, T. G., Ohlstein, B., Allen, A. et al. (2007). The carnegie protein trap library: a versatile tool for *Drosophila* developmental studies. *Genetics* **175**, 1505-1531.
- Casal, A. and Struhl, G. (2004). Reading the Hedgehog morphogen gradient by measuring the ratio of bound to unbound Patched protein. *Nature* **431**, 76-80.
- Casares, F. and Mann, R. S. (2000). A dual role for homothorax in inhibiting wing blade development and specifying proximal wing identities in *Drosophila*. *Development* **127**, 1499-1508.
- Chen, Y. and Struhl, G. (1996). Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* **87**, 553-563.
- Cheyette, B. N., Green, P. J., Martin, K., Garren, H., Hartenstein, V. and Zipursky, S. L. (1994). The *Drosophila* sine oculus locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron* **12**, 977-996.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H. and Beachy, P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407-413.
- Davidson, E. H. (2006) *The Regulatory Genome: Gene Regulatory Networks in Development and Evolution*. San Diego, CA: Academic Press.
- Dessaud, E., Yang, L. L., Hill, K., Cox, B., Ulloa, F., Ribeiro, A., Mynett, A., Novitsch, B. G. and Briscoe, J. (2007). Interpretation of the sonic hedgehog

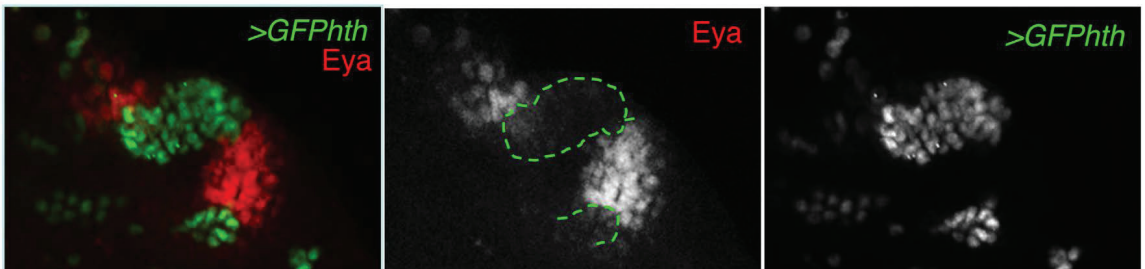


- morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature* **450**, 717-720.
- Dessaud, E., McMahon, A. P. and Briscoe, J. (2008). Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* **135**, 2489-2503.
- Dessaud, E., Ribes, V., Balaskas, N., Yang, L. L., Pierani, A., Kicheva, A., Novitsch, B. G., Briscoe, J. and Sasai, N. (2010). Dynamic assignment and maintenance of positional identity in the ventral neural tube by the morphogen sonic hedgehog. *PLoS Biol.* **8**, e1000382.
- Domínguez, M., Brunner, M., Hafen, E. and Basler, K. (1996). Sending and receiving the hedgehog signal: control by the Drosophila Gli protein Cubitus interruptus. *Science* **272**, 1621-1625.
- Dupé, V., Rochard, L., Mercier, S., Le Pétilion, Y., Gicquel, I., Bendavid, C., Bourrouillou, G., Kini, U., Thauvin-Robinet, C., Bohan, T. P. et al. (2011). NOTCH, a new signaling pathway implicated in holoprosencephaly. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 1122-1131.
- Eaton, S. and Kornberg, T. B. (1990). Repression of ci-D in posterior compartments of Drosophila by engrailed. *Genes Dev.* **4**, 1068-1077.
- Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H. and Jessell, T. M. (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* **87**, 661-673.
- Finkelstein, R., Smouse, D., Capaci, T. M., Spradling, A. C. and Perrimon, N. (1990). The orthodenticle gene encodes a novel homeo domain protein involved in the development of the Drosophila nervous system and ocellar visual structures. *Genes Dev.* **4**, 1516-1527.
- Freeman, M. and Gurdon, J. B. (2002). Regulatory principles of developmental signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 515-539.
- González, A., Chaouiya, C. and Thieffry, D. (2008). Logical modelling of the role of the Hh pathway in the patterning of the Drosophila wing disc. *Bioinformatics* **24**, i234-i240.
- Guillén, I., Mullor, J. L., Capdevila, J., Sánchez-Herrero, E., Morata, G. and Guerrero, I. (1995). The function of engrailed and the specification of Drosophila wing pattern. *Development* **121**, 3447-3456.
- Haynie, J. L. and Bryant, P. J. (1986). Development of the eye-antenna imaginal disc and morphogenesis of the adult head in Drosophila melanogaster. *J. Exp. Zool.* **237**, 293-308.
- Heemskerk, J., DiNardo, S., Kostriken, R. and O'Farrell, P. H. (1991). Multiple modes of engrailed regulation in the progression towards cell fate determination. *Nature* **352**, 404-410.
- Hidalgo, A. and Ingham, P. (1990). Cell patterning in the Drosophila segment: spatial regulation of the segment polarity gene patched. *Development* **110**, 291-301.
- Ingham, P. W., Nakano, Y. and Seger, C. (2011). Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 393-406.
- Irons, D. J., Wojcinski, A., Glise, B. and Monk, N. A. (2010). Robustness of positional specification by the Hedgehog morphogen gradient. *Dev. Biol.* **342**, 180-193.
- Jaynes, J. B. and O'Farrell, P. H. (1991). Active repression of transcription by the engrailed homeodomain protein. *EMBO J.* **10**, 1427-1433.
- Jiang, J. and Hui, C. C. (2008). Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev. Cell* **15**, 801-812.
- Kobayashi, M., Fujioka, M., Tolkunova, E. N., Dekka, D., Abu-Shaar, M., Mann, R. S. and Jaynes, J. B. (2003). Engrailed cooperates with extradenticle and homothorax to repress target genes in Drosophila. *Development* **130**, 741-751.
- Kumar, J. P. and Moses, K. (2001). EGF receptor and Notch signaling act upstream of Eyeless/Pax6 to control eye specification. *Cell* **104**, 687-697.
- Kwon, D., Mucci, D., Langlais, K. K., Americo, J. L., DeVido, S. K., Cheng, Y. and Kassisi, J. A. (2009). Enhancer-promoter communication at the Drosophila engrailed locus. *Development* **136**, 3067-3075.
- le Roux, I., Lewis, J. and Ish-Horowitz, D. (2003). Notch activity is required to maintain floorplate identity and to control neurogenesis in the chick hindbrain and spinal cord. *Int. J. Dev. Biol.* **47**, 263-272.
- Li, X., Cassidy, J. J., Reinke, C. A., Fischboeck, S. and Carthew, R. W. (2009). A microRNA imparts robustness against environmental fluctuation during development. *Cell* **137**, 273-282.
- Marigo, V. and Tablin, C. J. (1996). Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9346-9351.
- Méhot, N. and Basler, K. (1999). Hedgehog controls limb development by regulating the activities of distinct transcriptional activator and repressor forms of Cubitus interruptus. *Cell* **96**, 819-831.
- Mutsuddi, M., Chaffee, B., Cassidy, J., Silver, S. J., Tootle, T. L. and Rebay, I. (2005). Using Drosophila to decipher how mutations associated with human branchio-oto-renal syndrome and optical defects compromise the protein tyrosine phosphatase and transcriptional functions of eyes absent. *Genetics* **170**, 687-695.
- Nahmad, M. and Stathopoulos, A. (2009). Dynamic interpretation of hedgehog signaling in the Drosophila wing disc. *PLoS Biol.* **7**, e1000202.
- Nakano, Y., Guerrero, I., Hidalgo, A., Taylor, A., Whittle, J. R. and Ingham, P. W. (1989). A protein with several possible membrane-spanning domains encoded by the Drosophila segment polarity gene patched. *Nature* **341**, 508-513.
- Ohmeyer, J. T. and Kalderon, D. (1998). Hedgehog stimulates maturation of Cubitus interruptus into a labile transcriptional activator. *Nature* **396**, 749-753.
- Pauli, T., Seimiya, M., Blanco, J. and Gehring, W. J. (2005). Identification of functional sine oculis motifs in the autoregulatory element of its own gene, in the eyeless enhancer and in the signalling gene hedgehog. *Development* **132**, 2771-2782.
- Peyrot, S. M., Wallingford, J. B. and Harland, R. M. (2011). A revised model of Xenopus dorsal midline development: differential and separable requirements for Notch and Shh signaling. *Dev. Biol.* **352**, 254-266.
- Pichaud, F. and Casares, F. (2000). homothorax and irquois-C genes are required for the establishment of territories within the developing eye disc. *Mech. Dev.* **96**, 15-25.
- Probst, S., Kraemer, C., Demougin, P., Sheth, R., Martin, G. R., Shiratori, H., Hamada, H., Iber, D., Zeller, R. and Zuniga, W. J. (2011). SHH propagates distal limb bud development by enhancing CYP26B1-mediated retinoic acid clearance via AER-FGF signalling. *Development* **138**, 1913-1923.
- Punzo, C., Seimiya, M., Flister, S., Gehring, W. J. and Plaza, S. (2002). Differential interactions of eyeless and twin of eyeless with the sine oculis enhancer. *Development* **129**, 625-634.
- Ribes, V., Balaskas, N., Sasai, N., Cruz, C., Dessaud, E., Cayuso, J., Tozer, S., Yang, L. L., Novitsch, B., Marti, E. et al. (2010). Distinct Sonic Hedgehog signaling dynamics specify floor plate and ventral neuronal progenitors in the vertebrate neural tube. *Genes Dev.* **24**, 1186-1200.
- Royet, J. and Finkelstein, R. (1995). Pattern formation in Drosophila head development: the role of the orthodenticle homeobox gene. *Development* **121**, 3561-3572.
- Royet, J. and Finkelstein, R. (1996). hedgehog, wingless and orthodenticle specify adult head development in Drosophila. *Development* **122**, 1849-1858.
- Royet, J. and Finkelstein, R. (1997). Establishing primordia in the Drosophila eye-antennal imaginal disc: the roles of decapentaplegic, wingless and hedgehog. *Development* **124**, 4793-4800.
- Saha, K. and Schaffer, D. V. (2006). Signal dynamics in Sonic hedgehog tissue patterning. *Development* **133**, 889-900.
- Sanicola, M., Sekelsky, J., Elson, S. and Gelbart, W. M. (1995). Drawing a stripe in Drosophila imaginal disks: negative regulation of decapentaplegic and patched expression by engrailed. *Genetics* **139**, 745-756.
- Schwartz, C., Locke, J., Nishida, C. and Kornberg, T. B. (1995). Analysis of cubitus interruptus regulation in Drosophila embryos and imaginal disks. *Development* **121**, 1625-1635.
- Serikaku, M. A. and O'Tousa, J. E. (1994). Sine oculis is a homeobox gene required for Drosophila visual system development. *Genetics* **138**, 1137-1150.
- Tabata, T., Schwartz, C., Gustavson, E., Ali, Z. and Kornberg, T. B. (1995). Creating a Drosophila wing de novo, the role of engrailed, and the compartment border hypothesis. *Development* **121**, 3359-3369.
- Varjosalo, M. and Taipale, J. (2008). Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.* **22**, 2454-2472.
- von Dassow, G., Meir, E., Munro, E. M. and Odell, G. M. (2000). The segment polarity network is a robust developmental module. *Nature* **406**, 188-192.
- Wang, L. H., Huang, Y. T., Tsai, Y. C. and Sun, Y. H. (2010). The role of eyg Pax gene in the development of the head vertex in Drosophila. *Dev. Biol.* **337**, 246-258.
- Wieschaus, E., Perrimon, N. and Finkelstein, R. (1992). orthodenticle activity is required for the development of medial structures in the larval and adult epidermis of Drosophila. *Development* **115**, 801-811.
- Xu, T. and Rubin, G. M. (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues. *Development* **117**, 1223-1237.

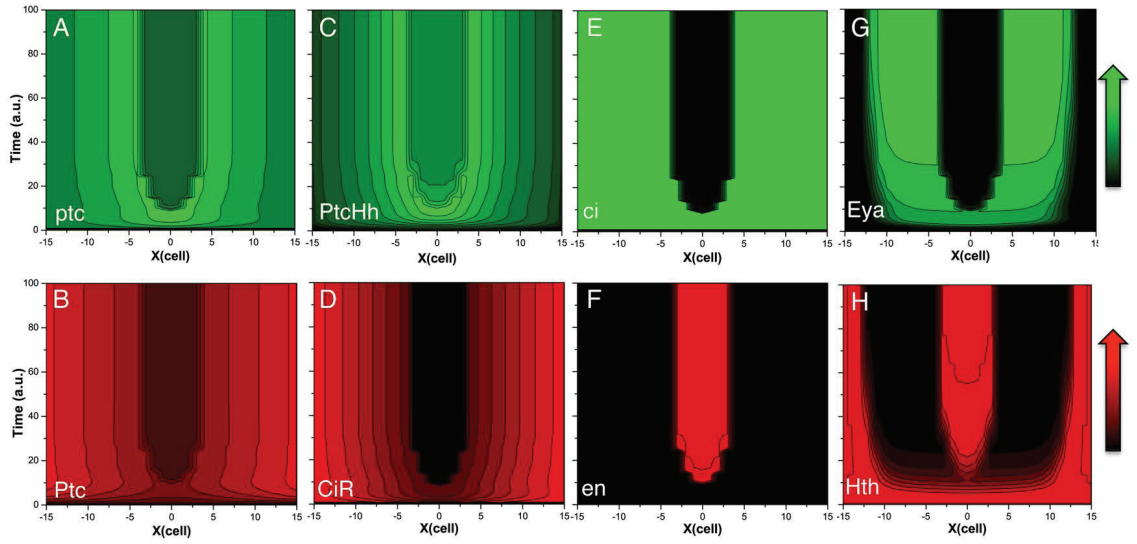




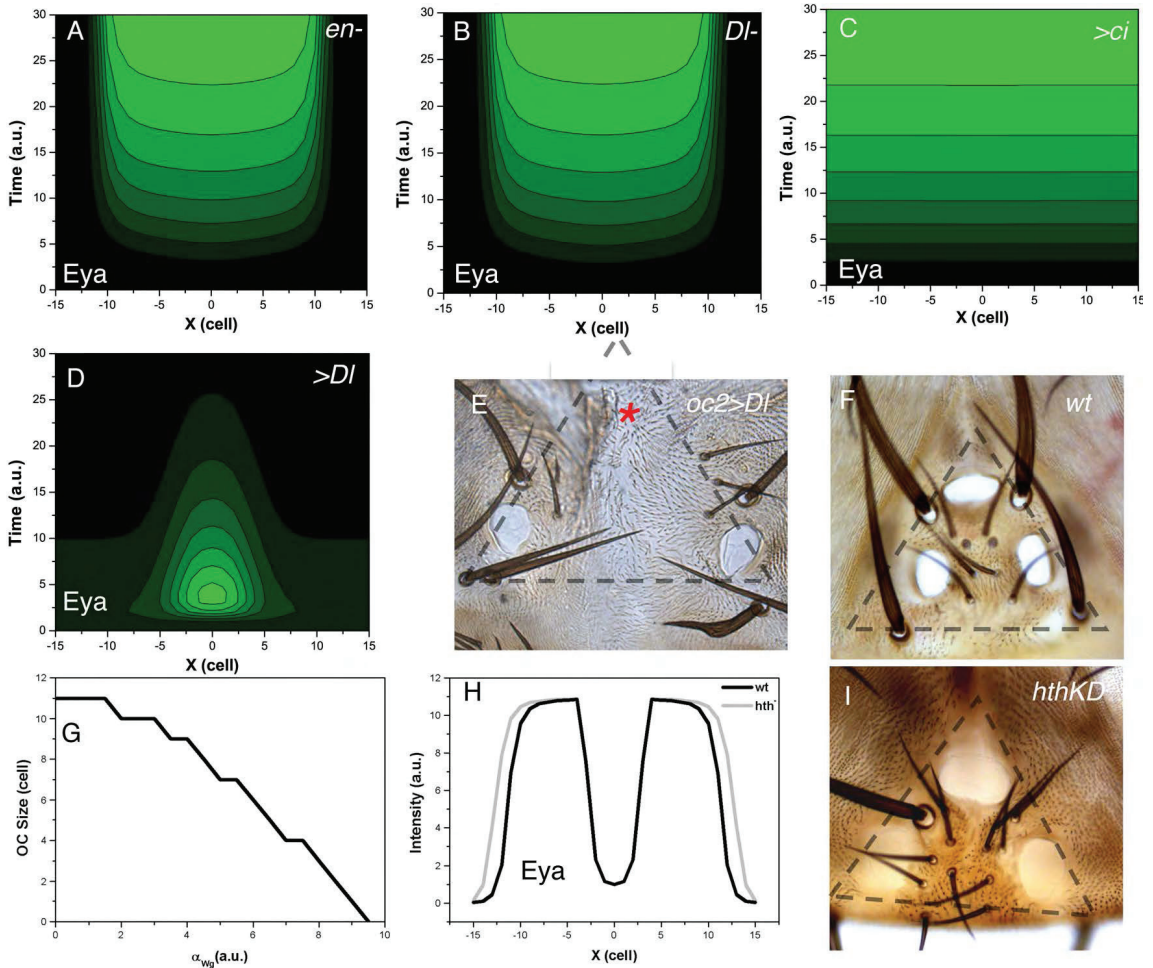
**Fig. S1. Temporal requirement of *Dl/Notch* signaling for interocellar fate establishment.** (A) Five-hour collections of *oc2>Dl-RNAi* embryos were grown at 25°C and shifted to 29°C at different developmental times as indicated. Representative views of the ocellar complex are shown. Maintenance of the culture at 25°C results in wild-type flies (last panel). Shifted animals develop macrobristles in the interocellar region, instead of the normal microbristles in the wild type. This is probably due to precocious bristle differentiation in the absence of *Dl* signaling, independent of the earlier role in interocellar fate specification of *Dl*. (B) Quantification of the number of interocellar bristles (yellow squares with standard error bars). Rectangles represent the percentage of flies with fused (cyclopic) and unfused ocelli. After 85 hpf, the interocellar region becomes *Dl/Notch* independent.



**Fig. S2. *hth* represses *Eya* cell-autonomously.** *GFPtht*-expressing clones (green) in the ocellar field, stained for *Eya* expression. Merged and single channels are shown. *GFPtht* represses *eya* expression cell autonomously. The clones are outlined on the *Eya* channel.

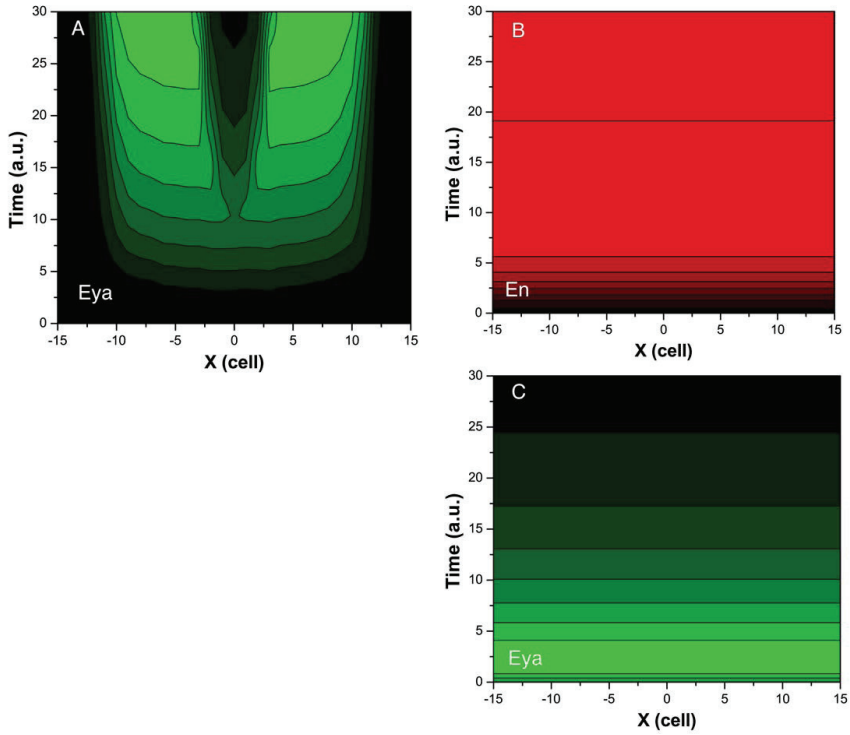


**Fig. S3. Spatiotemporal dynamics of model variables.** Surface contour plots showing the spatiotemporal patterns of model variables not described in Fig. 6. Capitalized names indicate protein products, whereas non-capitalized names indicate transcript species. a.u., arbitrary units. Cell number is represented on the  $x$  axis.

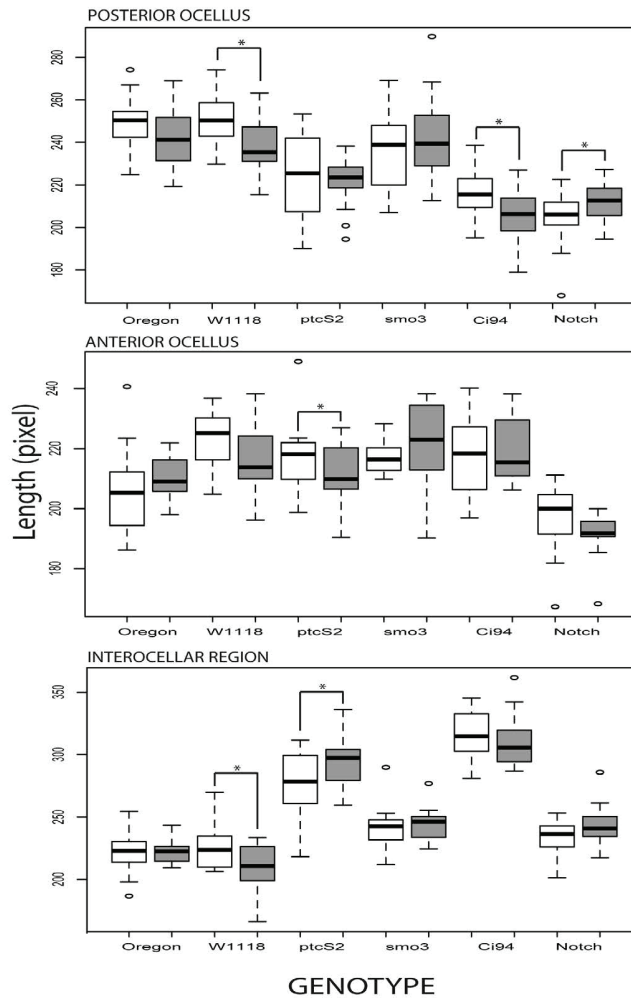


**Fig. S4. Analysis of mutant genotypes.** (A-D) Spatiotemporal dynamics of Eya expression predicted in modeled mutants, as indicated in each panel. To mimic loss of function mutations in *en*, *Dl* and *hth*, the following parameters values were used:  $\theta_{en}=0$ ;  $k_{DlEn}=2$ ;  $\alpha_{wgth}=0$ , respectively. The overexpression of *ci* and *Dl* were modeled by increasing the *ci* basal transcription rate ( $\alpha_{ci}=6$ ) and by reducing  $k_{DlEn}$  ( $k_{DlEn}=0.1$ ), respectively. Simulations of *en* (A) and *Dl* (B) loss reproduce qualitatively the results shown in Fig. 3C and Fig. 4A,C (expansion of the ocellar/Eya domain and loss of the interocellar region). Overexpression of *ci* (C) results in extended Eya-positive/ocellar tissue, as observed experimentally in Fig. 3G. *Dl* overexpression is predicted to expand the interocellar region at the expense of the Eya-expressing domains (D) (and thereby the ocelli) which, with the parameters used, result in the loss of ocelli. (E,F) When this prediction is tested in vivo by overexpression of *Dl* driven by *oc2-GAL4* (*oc2>Dl*), the interocellar region expands notably and the anterior ocellus disappears (asterisk). The posterior ocelli are abnormally shaped, but still present (E), suggesting uneven expression of the *oc2-GAL4* driver in the ocellar region or unrecognized biological asymmetries between anterior and posterior ocelli. (G) The expression of *hth* is predicted to regulate the size of the ocellar domain, such that as its transcription increases (i.e. increasing  $\alpha_{wg}$ ) the ocellar domain (the number of Eya-expressing cells) decreases. (H) Therefore, when *hth* transcription is shut off, the Eya domain expands. (I) This is indeed what is detected by knocking down in vivo *hth* expression, in *oc2>hthRNAi* (*'hthKD'*) individuals. Note the irregular perimeter of the ocelli in this genotype. a.u., arbitrary units.





**Fig. S5. Convergence to the wild-type pattern with varying initial conditions.** Surface contour plots showing the spatiotemporal patterns of model variables. (A) Evolution of Eya pattern when the initial value of every system variable was randomized (up to a 10-fold change) in each individual cell. The different initial conditions applied to each cell describe a fluctuating spatiotemporal pattern in the first time steps. These fluctuations are smoothed with time as the system converges to a stable stationary solution. (B,C) Evolution of En (B) and Eya (C) when the initial condition for En exceeds the concentration determined by the parameter  $k_{DlEn}$ , responsible for En autoregulation ( $k_{DlEn} > 0.2$ ).

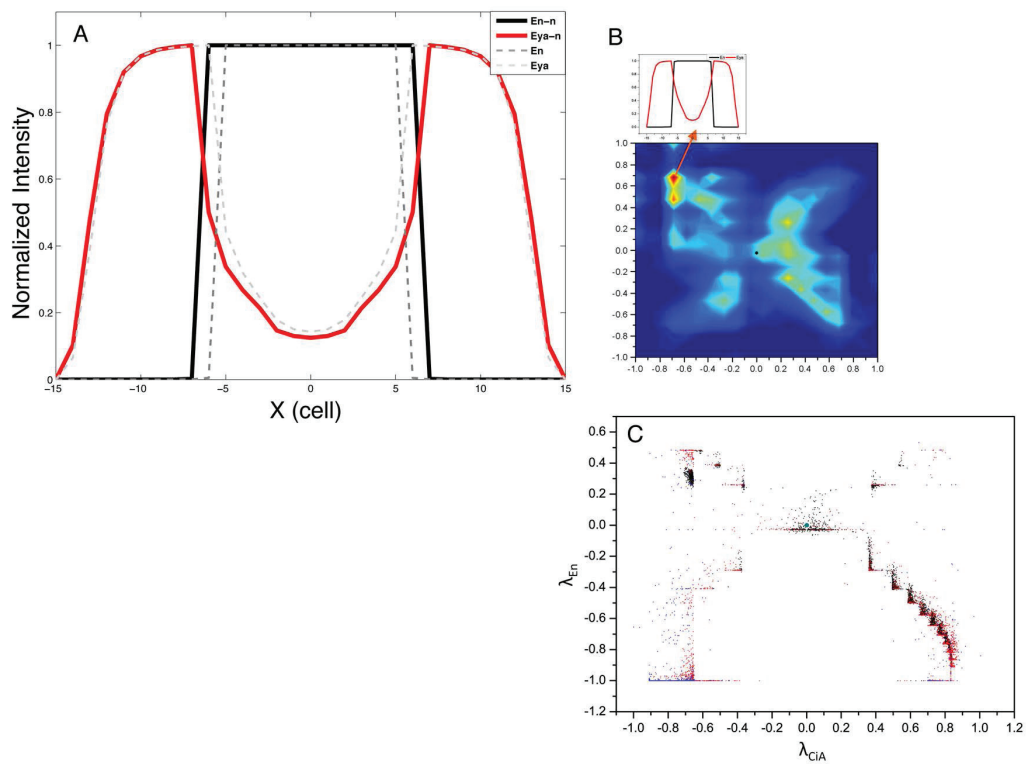


Coefficient of Variation (Cv) expressed in percentage

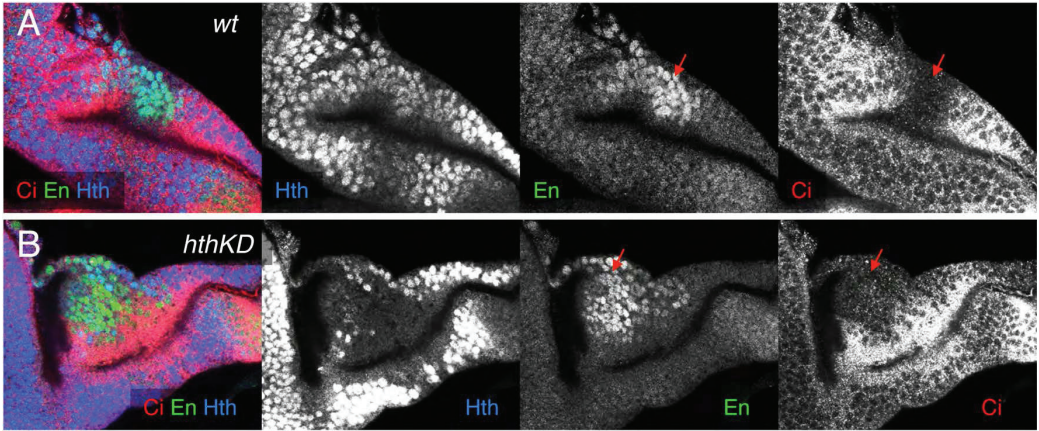
	Posterior Ocellus		Anterior Ocellus		Intero-cellular Region	
Oregon/Oregon*	4,72	5,98	3,94	4,39	7,29	4,71
W1118/W1118*	4,84	6,39	6,59	6,84	7,42	8,69
ptcS2/ptcS2*	8,23	5,04	4,98	3,09	11,15	6,48
smo3/smo3*	7,24	7,52	7,05	6,06	7,32	5,05
Ci94/Ci94*	5,23	5,99	4,93	7,27	5,95	6,57
Notch/Notch*	5,97	4,15	4,99	4,99	3,49	6,40

\* with temperature cycles

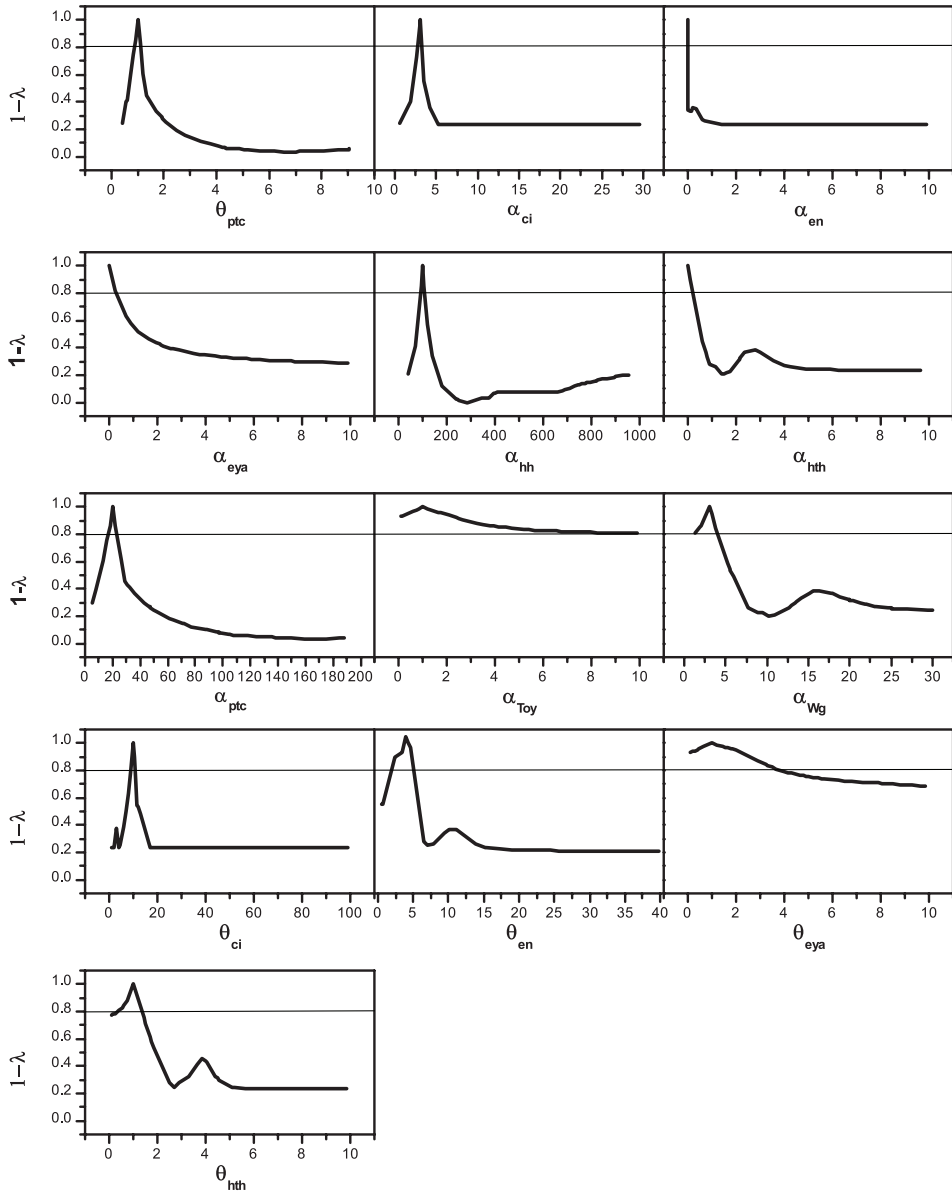
**Fig. S6. Quantitative variations in ocellar structures under temperature perturbations.** Box plot showing measurements of the posterior ocellus, anterior ocellus and the intero-cellular region in the indicated genotypes. Length is expressed in pixels. White boxes represent strains grown at constant 25°C whereas gray boxes represent strains subjected to temperature cycles (see Materials and methods). Circles denote outliers above or below the inter-quartile range. Number of measured anterior ocelli, posterior ocelli and intero-cellular regions is 10, 20 and 20, respectively. Only females were included. Asterisks indicate significant differences between two experimental conditions ( $P<0.05$ ). Below, the table contains the coefficient of variation within genotypes, expressed in percentage.



**Fig. S7. Analysis of dense cluster pattern.** (A,B) Noise effect on En and Eya profiles (A) over a specific pattern (B) situated in a dense cluster 'far', in global distance, from the wild type (0,0). (C) Projection of 10000 solution points corresponding to a randomized variation of all the sensitive parameters in ranges with complementary distance with value >0.8 (black dots), between 0.6 and 0.8 (red dots) and between 0.4 and 0.6 (blue dots). The projection is carried out on En and CiA distance patterns. There is significant overlap in the distribution of patterns generated by black, red and blue parameters, even though blue dots ('bad' parameters) tend to give patterns farther from (0,0).



**Fig. S8.** *hth* regulates ocellar size without affecting *en* expression and its repression of the *hh* pathway. **(A,B)** Ocellar fields of control (A) and *oc2>hth(RNAi)* (*hthKD*), stained for Hth, En and Ci (B). In *hthKD* discs, Hth signal disappears in the whole ocellar field except for a few cells. In this genotype, *en* expression is detected at normal levels and Ci signal is downregulated in *en*-expressing cells. Red arrows indicate the En-expressing domain.



**Fig. S9. Parameter sensitivity analysis plot.** Goodness score ( $1-\lambda$ ) for Eya pattern as a function of parameter values.  $\lambda$  is the Euclidean distance between the control Eya pattern and the pattern produced by a new value of the parameter.  $1-\lambda$  was calculated for each parameter in a range of two orders of magnitude around the control value of the parameter. Goodness scores above 0.8 (line) are considered 'good' (i.e. within this range, the variation of the respective pattern results in Eya expression patterns closely resembling the control, or wild-type, pattern).

**Table S1. Parameters and values used in the model.** List of parameters used in the system with their control values. The list of parameters consists of different types:  $\alpha_x$  for the basal transcription rates,  $\beta_x$  for the degradation rates,  $\kappa_x$  for the Hill equation transcriptional regulators,  $n_x$  for the Hill coefficients,  $\theta_x$  for the translation rates;  $\gamma_{Ptc\ Hh}$  for the protein complex formation of Ptc and Hh; the non-dimensional parameters  $\kappa_{ci}$ ,  $\kappa_{ciA}$ ,  $\kappa_{ciR}$  and  $\kappa_{ciptc}$  are different parameters used for changing the scale of different terms and D the diffusion coefficient. The values ranges correspond to a complementary distance to Eya wild-type pattern of ( $\geq 0.8$ ), ( $\geq 0.6$  and  $< 0.8$ ) and ( $\geq 0.4$  and  $< 0.6$ ).

Parameter	Value	$1-\lambda \geq 0.8$	$0.6 \geq 1-\lambda > 0.8$	$0.4 \geq 1-\lambda > 0.6$
$\alpha_{ci}$	3	[2.75,3.27]	[2.24,2.75] $\cup$ [3.27,3.46]	[2.24,2.75] $\cup$ [3.27,3.46]
$\alpha_{en}$	0	[0,0]	-	-
$\alpha_{eya}$	0	[0,0.3]	(0.3,0.8]	(0.8,2.42]
$\alpha_{hh}$	100	[91.2,106.6]	[80.2, 91.2] $\cup$ (106.6,117.6]	[67.03, 80.2] $\cup$ (117.6,132.96]
$\alpha_{hth}$	0	[0,0.2]	(0.2,0.42]	(0.42,0.67]
$\alpha_{ptc}$	20	[16.9,23.1]	[13.46, 16.9] $\cup$ (23.1,26.15]	[8.07, 13.46] $\cup$ (26.15,32.69]
$\alpha_{Toy}$	1	[0.1,10]	-	-
$\alpha_{Wg}$	3	[1.2,4.0]	(4.00, 5.06]	(5.06, 6.66]
$\beta_{ci}$	0.6	[0.1,6.0]	-	-
$\beta_{ciA}$	0.5	[0.37,0.64]	[0.20, 0.37] $\cup$ (0.64,0.81]	(0.81,1.00]
$\beta_{ciR}$	0.5	[0.4,0.65]	[0.26,0.4] $\cup$ (0.65,0.9]	(0.9,1.3]
$\beta_{en}$	0.1	[0.01,1.0]	-	-
$\beta_{eya}$	0.1	[0.01,1.0]	-	-
$\beta_{hh}$	0.1	[0.03,0.22]	(0.22,0.34]	(0.34,0.72]
$\beta_{hth}$	0.1	[0.01,1.0]	-	-
$\beta_{En}$	0.5	[0.28,1.1]	[0.21,0.28] $\cup$ (1.1,1.55]	[0.14,0.21] $\cup$ (1.55,5]
$\beta_{Eya}$	0.1	[0.01,0.55]	-	-
$\beta_{Hth}$	0.5	[0.38,1.35]	-	-
$\beta_{Ptc}$	0.5	[0.38,0.67]	[0.3,0.38] $\cup$ (0.67,0.98]	[0.2,0.3] $\cup$ (0.98,1.63]
$\beta_{ptc}$	0.5	[0.05,5.0]	-	-
$\beta_{ptcHh}$	0.5	[0.43,0.57]	[0.36,0.43] $\cup$ (0.57,0.65]	[0.27,0.36] $\cup$ (0.65,1.04]
D	0.5	[0.4,0.57]	[0.24,0.4] $\cup$ (0.57,0.68]	[0.13,0.24] $\cup$ (0.68,2.6]
$\gamma_{Ptc\_Hh}$	0.05	[0.045,0.11]	[0.04,0.045] $\cup$ (0.11,0.15]	[0.01,0.04] $\cup$ (0.15,0.25]
$\kappa_0$	10	[4.0,100]	-	-
$\kappa_{ci}$	15	[12.1,19.6]	[9.3,12.1] $\cup$ (19.6,24.5]	[7.43,9.3] $\cup$ (24.5,51.9]
$\kappa_{En}$	2	[0.26,5.50]	[5.50,20]	-
$\kappa_{Ciptc}$	30	[19.87,40.0]	[10.89,19.87] $\cup$ (40,43.15]	[2,10.89] $\cup$ (43.15,74.3]
$\kappa_{ci}$	0.1	[0.01,0.216]	(0.216,0.40]	(0.4,0.78]
$\kappa_{ciA}$	2	[1.8,2.4]	[1.62,1.8] $\cup$ (2.40,2.72]	[1.11,1.62] $\cup$ (2.72,3.13] $\cup$ (3.81,8.99]
$\kappa_{ciAen}$	5	[3.46,9.95]	[2.80,3.46] $\cup$ (9.95,15.8]	[2.30,2.80] $\cup$ (15.8,50.0]
$\kappa_{ciAeya}$	7	[1.0,100]	-	-
$\kappa_{ciAptc}$	10	[6.26,21.2]	[3.72,6.26] $\cup$ (21.2,75.0]	[2.30,3.72] $\cup$ (75.0,100]
$\kappa_{ciRen}$	1	[0.76,1.24]	[0.49,0.76] $\cup$ (1.24,1.65]	[0.1,0.49] $\cup$ (1.65,2.27] $\cup$ (2.8,3.33]
$\kappa_{ciRptc}$	5	[1.7,18.4]	[0.8,1.7] $\cup$ (18.4,50]	-
$\kappa_{DIEen}$	0.2	[0.16,0.45]	[0.14,0.16] $\cup$ (0.45,0.91]	[0.01,0.14] $\cup$ (0.91,10]
$\kappa_{Enci}$	0.5	[0.1,1.1]	-	-
$\kappa_{Enptc}$	25	[5.1,250]	-	-
$\kappa_{Eya}$	20	[3.38,200]	-	-
$\kappa_{Eyahth}$	8	[0.8,80]	-	-
$\kappa_{Htheya}$	2	[1.58,5.0]	-	-
$\kappa_{PH}$	0.13	[0.11,0.14]	[0.1,0.11] $\cup$ (0.14,0.17]	[0.07,0.1] $\cup$ (0.17,0.24]



$K_{Wg}$	2	[1.66,3.40]	-	-
$n_{ci}$	1	[1,2]	[3,100]	-
$n_{CIA}$	4	[4,5]	$3 \cup [6,10]$	$2 \cup [11,100]$
$n_{CIAen}$	1	[1,1]	[2,100]	-
$n_{CIAeya}$	9	[1,100]	-	-
$n_{CIAptc}$	1	[1,100]	-	-
$n_{CiRen}$	4	[4,4]	3,5	-
$n_{CiRptc}$	1	[1,5]	[6,100]	-
$n_{En}$	10	[7,100]	-	-
$n_{Enci}$	12	[4,100]	-	-
$n_{Enptc}$	5	[1,100]	-	-
$n_{Eya}$	2	[2,100]	-	-
$n_{Hth}$	2	[1,5]	-	-
$n_{pH}$	1	[1,1]	-	-
$n_{Wg}$	2	[2,3]	-	-
$\theta_{ci}$	10	[9.12,10.6]	$[7.58,9.12] \cup (10.6,11.7]$	$[6.00,7.58] \cup (11.7,14.3]$
$\theta_{en}$	4	[2.12,5.0]	$[1.00,2.12] \cup (5.00,5.50]$	$[0.62,1.00] \cup (5.50,6.25]$
$\theta_{eya}$	1	[0.1,3.88]	[3.88,10.0]	-
$\theta_{hth}$	1	[0.4,1.33]	[1.33,1.74]	$[1.74,2.20] \cup (3.60,4.10]$
$\theta_{ptc}$	1	[0.89,1.12]	$[0.71,0.89] \cup (1.12,1.19]$	$[0.55,0.71] \cup (1.19,1.47]$



Table S2. Initial condition for each system variable.

Variable	Description	Initial Condition
Hh	Hh concentration	0.1 $\mu M$
ptc	ptc concentration	0.1 $\mu M$
Ptc	Ptc concentration	0.1 $\mu M$
PtcHh	PtcHh complex concentration	0.1 $\mu M$
ci	ci concentration	0.1 $\mu M$
CiA	CiA concentration	0.1 $\mu M$
CiR	CiR concentration	0.1 $\mu M$
en	en concentration	0.01 $\mu M$
En	En concentration	0.01 $\mu M$
eya	eya concentration	0.1 $\mu M$
Eya	Eya concentration	0.1 $\mu M$
hth	hth concentration	0.75 $\mu M^*$
Hth	Hth concentration	1.5 $\mu M^{**}$

\* Initial *hth* concentration correspond to its stationary value in the absence of Eya repression ( $[hth] = \kappa_0 \beta_{hth} (\alpha_{hth} + \alpha_{wg} / k_{wg}^{n_{wg}})$ ). \*\* Initial Hth concentration corresponds to its stationary value ( $[Hth] = \theta_{hth} [hth] / \beta_{hth}$ ). See table 1 for parameter values.

**APPENDIX 1 FOR****A Hh-driven gene network controls specification, pattern and size of the *Drosophila* simple eyes.**

D Aguilar-Hidalgo<sup>§1,2</sup>, MA Domínguez-Cejudo<sup>§1</sup>, G. Amore<sup>3</sup>, A Brockmann<sup>1,4</sup>, MC Lemos<sup>2</sup>, A Córdoba<sup>2</sup>, F Casares<sup>1\*</sup>.

§- Equal contribution authors, listed in alphabetical order.

- 1- CABD (CSIC-UPO-Junta de Andalucía), Sevilla, Spain.
- 2- Condensed Matter Physics Dept. (U. Sevilla), Sevilla, Spain.
- 3- Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli, Italy.
- 4- Current address: University of Konstanz, Germany

\* Corresponding author: fcasfer@upo.es

**Design and implementation of the ocellar mathematical model.**

The design of this model is based on differential equations of the reaction-diffusion type. This model consists of 13 equations, one for each system variable (genes transcription and protein production) in a row of 31 cells with a symmetrical distribution of cells centered on the morphogen source (5 middle cells). Globally, the mathematical model comprises 403 ordinary differential equations (ODEs).

The design of the equation system follows the formulation paradigm used by von Dassow et al. (von Dassow et al., 2000). This methodology distinguishes between mRNA transcription and protein translation. Translation is described as linear terms of production and degradation. Transcriptional regulation is described with non-linear terms, either positive or negative, in the form of compound Hill equations. The specific form of these type of terms is  $\phi(X\psi((Y,k_2,n_2),k_1,n_1))$ , where

$$\phi(X,k,n) = \frac{X^n}{k^n + X^n} \quad (s1)$$

and

$$\psi(Y,k,n) = \left( 1 - \frac{Y^n}{k^n + Y^n} \right), \quad (s2)$$

so

$$\phi(X\psi(Y,k_2,n_2),k_1,n_1) = \frac{X^{n_1} \left( 1 - \frac{Y^{n_2}}{k_2^{n_2} + Y^{n_2}} \right)^{n_1}}{k_1^{n_1} + X^{n_1} \left( 1 - \frac{Y^{n_2}}{k_2^{n_2} + Y^{n_2}} \right)^{n_1}} \quad (s3)$$

The ocellar model also contains autoregulations. In these cases, the equation term is described as a simple sigmoid in the form  $\phi(X,k,n)$ .

### **Parameter Sensitivity Analysis: one-by-one analysis.**

Once a wild type set of parameter values had been found we tested whether these values are unique or if, on the contrary, it is possible to find different parameter sets that also lead to correct behaviors. One would expect that this latter option to be found, as organ development should be evolutionarily prepared to remain relatively constant in the face of fluctuations (i.e. to be robust) some of which may affect the biochemical properties of the gene networks controlling this development.

To analyze this issue, we carried out a parameter sensitivity analysis. The major problem we face is, once more, the large number of parameters. Therefore, we proceeded in two phases. In the first phase, we explored the parameter space modifying just one dimension (parameter) at a time; the rest of parameters are fixed to the “control” or wild type values. To do this, we defined a searching range for each parameter of two orders of magnitude around the “control” value for the wild type pattern. The resulting pattern was compared to the wild type and a goodness score obtained. This score represents the Euclidean distance ( $\lambda$ ) between the Eya wild pattern and the Eya pattern drawn by the new set of parameters. To calculate the score, it was considered that both, the wild type (A) and the new (B) Eya patterns are described by two 31 component vectors (one component for each cell in the system). Then, the distance between these two vectors is defined as their Euclidean norm.

$$\lambda = \|\overline{AB}\| = \sqrt{\sum_i (b_i - a_i)^2} \quad (\text{s4})$$

where  $a_i$  and  $b_i$  are the components of vectors A and B, respectively.

In Sup. Figure S9 the distance distributions (considered as complementary distance,  $1 - \lambda$ ) for all the system parameters are shown. From this analysis it is possible to extract important information about which parameters are more sensitive or more insensitive to variations away from the control parameter



values. In fact, some parameters can be considered quite insensitive, as their distances do not undergo significant changes.

A complementary distance value of 0.8 was selected as a “goodness” threshold, as every pattern checked for a parameter set with a complementary distance value equal or higher to this value fits the target ocellar pattern.

Following this “goodness” threshold, every parameter whose distance distribution falls below 0.8 is considered “sensitive” (33 parameters); and parameters whose distance distribution always remains above this threshold are considered “insensitive” (28 parameters). There are some parameters among the sensitive ones that are extremely sensitive as their variation range above the distance threshold is really small. The most restrictive parameter is  $\alpha_{en}$ , which is responsible of the basal transcription of gene *en*. The wild type condition makes this parameter null. The sensitivity analysis predicts that this parameter should remain null or otherwise the distance value would fall.

At this point, we have determined which are the sensitive parameters and which can be freely varied without major consequence in the patterning. We have also established which are the ranges within which each sensitive parameter can be modified while the pattern obtained still remains within a given goodness distance interval.

### **Parameter Sensitivity Analysis: multiparametric analysis.**

In the second phase we reconsidered the full parameter space exploration but eliminating from this study the insensitive parameters, and restricting the value ranges to those that give “good” patterning. Although these restrictions can be made, the resulting pattern is not assured to be “good”, as the parameter space is still vast and the high complexity of the system might provide really “far” distance values just when modifying two parameters simultaneously. In order to be able to distinguish if the system can give “bad” patterns from “good” parameter values and, if “bad” parameter values always return “bad” profiles, a goodness scaling can be prepared. From the results in the parameter sensitivity analysis, we calculated, in addition to the “good” ranges, the parameter value ranges for distances between 0.6 and 0.8 (“medium”), and between 0.4 and 0.6 (“bad”).

A total number of 10000 runs were obtained distributed in 6000 “good”, 3000 “medium” and 1000 “bad” randomized parameter values. With this 10000 parameter sets the distance for all the patterns of the system (one per variable) was calculated. In this way, each parameter set defines a point in a 13-dimensions space, each dimension being one of the model’s variables.

## **2D representation of the parameter sensitivity analysis**

In order to represent the analysis, it was important to define a method to calculate a global distance in this hyperspace for visualizing the results in 2D. In the first place, the Euclidean norm does not distinguish sign, that is, it is not possible to know which of the patterns, wild type and randomized, is bigger. So before calculating the norm it was determined which pattern defines a larger area under the curve. Thus, the distance between the two patterns is positive if the wild type pattern defines a larger area than the randomized pattern.

If we consider a 2D representation of the distance with sign, the wild type pattern would be placed in point (0,0). It is possible to plot just the distance from two different patterns out of 13 but this would just show the projection of the 13-dimensional points into 2D, and this projection may change depending on the two dimensions chosen for the plot. A method was implemented to visualize all the projections at one time.

To do so, first the normalized distance is divided into 0.1 length segments. Then the number of points in each 0.1x0.1 square for each projection of two variables was counted. The counting considered order, that is, the projection A-B is the same as B-A and just one of them is counted. This process is repeated for all the squares in the grid and for all the combinations of dimension pairs.

The result of this method can be seen in Figure 7F and Suppl. Fig. S7B. This plot represents the density of patterns from the 10000 randomized runs distributed relative to their distance from the wild type pattern. Therefore, this representation is a sort of phenotypic map produced by the network using the random sets of parameters.



**Biological simplifications:** The rationale for not including proliferation in the model, at least in this study, is the following: The development of the ocelli spans the second half of L3, that is, approximately 24 hours at 25°C. Our estimate of the doubling rates in the eye field is about 13 hours (CS Lopes and FC, unpublished). Since the ocellar region does not express neither *eyg* nor *upd*, genes involved in stimulating cell proliferation in the eye field downstream of *Notch*, we expect the doubling rate in the ocellar field to be 13 hours or lower, therefore justifying our assumption.

**Biological data used in the modeling of the Hh signaling pathway, including *en*.**

The nuclear transducer of the Hh signaling pathway is encoded by *ci*. *ci* gives rise to an uncleaved form of Ci. In the absence of signal, Ci is processed proteolitically (and thus irreversibly) into a transcriptional repressor, CiR (Aza-Blanc et al., 1997; Methot and Basler, 1999). However, in the presence of signal, Ci is converted into a transcriptional activator, CiA. Hh signaling strength depends on the ratio between bound (to Hh) and unbound Ptc (Casali and Struhl, 2004), so that the higher this ratio, the more CiA (and the less CiR) is produced. CiA and CiR are thought to bind to similar DNA sequences in vivo to activate and repress, respectively, a similar set of targets genes. These include *en* and the Hh receptor *ptc* (Alexandre et al., 1996; Methot and Basler, 1999; Biehs et al., 2010). Therefore, in our model we assume a similar regulation for *ptc* and *en* in the ocellar region. In addition, *ci* basal transcription can be repressed by En (Schwartz et al., 1995). Another key element in the Hh pathway is the regulation of *ptc*. *ptc* transcription is positively regulated by Hh signaling and negatively by En. Then, the Ptc protein can bind to Hh. The Ptc:Hh complex is degraded after endocytosis, thereby making this association step irreversible.

**Analysis of the Hh gradient steady state.**

It is known that *hh* transcription is restricted to the interocellar region, known as *hh*-expressing zone. In this region  $\delta(x) = 1$ .

Once the morphogen gradient reaches its steady state ( $t = t_{std}$ ) and Ptc is constant ( $[Ptc]$ ), we have:

$$\left. \frac{\partial Hh}{\partial t} \right|_{t=t_{std}} = 0 \quad (s5)$$

and,

$$D \frac{\partial^2 Hh}{\partial x^2} + \alpha_{hh} - \gamma_{Ptc\_Hh} [Ptc] \cdot Hh - \beta_{Hh} Hh = 0 \quad (s6)$$

or,

$$D \frac{\partial^2 Hh}{\partial x^2} + \alpha_{hh} - (\gamma_{Ptc\_Hh} [Ptc] + \beta_{Hh}) Hh = 0 \quad (s7)$$

The solution to this equation is:

$$Hh(x) = Hh_0 e^{-\frac{x}{\lambda}} - \frac{\alpha_{hh}}{\gamma_{Ptc\_Hh} [Ptc] + \beta_{Hh}} \quad (s8)$$

The parameter  $\lambda = \sqrt{D / (\gamma_{Ptc\_Hh} [Ptc] + \beta_{Hh})}$  is known as decay length, which corresponds to the distance at which the morphogen concentration decays by a factor of  $1/e$ .

From Fick's first law we can assert that the morphogen production rate is given by:

$$\alpha_{hh} = - \frac{\partial Hh}{\partial x} \quad (s9)$$

The flux direction is from higher concentration to lower concentration regions, being the flux a magnitude proportional to the gradient concentration. Thereby:

$$\alpha_{hh} = Hh_0 \sqrt{D (\gamma_{Ptc\_Hh} [Ptc] + \beta_{Hh})} \quad \text{at } x = 0 \quad (s10)$$





then,

$$Hh_0 = \frac{\alpha_{hh}}{\sqrt{D(\gamma_{Ptc\_Hh}[Ptc] + \beta_{Hh})}} \quad (\text{s11})$$

and,

$$Hh(x) = \frac{\alpha_{hh}}{\sqrt{D(\gamma_{Ptc\_Hh}[Ptc] + \beta_{Hh})}} e^{-\frac{x}{\sqrt{D(\gamma_{Ptc\_Hh}[Ptc] + \beta_{Hh})}}} - \frac{\alpha_{hh}}{\gamma_{Ptc\_Hh}[Ptc] + \beta_{Hh}} \quad (\text{s82})$$





# Apéndice III





## RESEARCH ARTICLE

# Regulation of Ocellar Specification and Size by *Twin of Eyeless* and *Homothorax*

Anette Brockmann,<sup>1</sup> María A. Domínguez-Cejudo,<sup>1</sup> Gabriele Amore,<sup>2</sup> and Fernando Casares<sup>1\*</sup>

The retinal determination gene network (RDGN) constitutes a paradigm of a gene network controlling organ specification and growth. In this study, we probed the RDGN in the *Drosophila* ocelli, a set of simple eyes located on the fly's dorsal head, by studying the expression, regulation, and function of *toy*, *hth*, *eya*, and *so*, members of the Pax6, Meis, Eya, and Six gene families. Our results highlight the role of the pax6 gene *toy*, together with the *hh* signaling pathway, in the initiation of *eya* and *so* expression; the engagement of *eya* and *so* in a feedback loop necessary for their full expression; and the interplay between *hh* signaling and *hth* as a mechanism of organ size control, as general regulatory steps in the specification of visual organs. *Developmental Dynamics* 240:75–85, 2011. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** toy; hth; retinal determination gene network; visual organ development; *Drosophila*; eya; so

Accepted 15 October 2010

## INTRODUCTION

Despite their different architecture and embryonic origin, the specification of the eye primordium in vertebrates and invertebrates is controlled by a set of homologous transcription factors and nuclear proteins, collectively known as retinal determination (RD) genes. RD genes include members of the Pax6, Six, Eya, Dach, and Meis gene families (Donner and Maas, 2004). In *Drosophila*, most of what is known about these genes and their retinal determination gene network (RDGN) has been derived from investigations of its compound eye (Silver and Rebay, 2005; Kumar, 2009; Amore and Casares, 2010). However, adult flies possess two types of light-sensing organs: the compound eyes and the ocelli. The three ocelli, one anterior ocellus (or *medial*) and

two posterior (or *lateral*) ocelli, are located at the vertices of a triangular patch of cuticle on the dorsal head which, in addition to the ocelli, also harbors a set of stereotypical mechanosensory chetae (Fig. 1A,B). Together, the cuticle patch, the ocelli, and the bristles are hereafter referred to as “ocellar complex.”

Both compound eye and ocelli derive from the eye–antennal imaginal disc (EAD), which also gives rise to most structures of the adult head, including the olfactory organs (antennae and maxillary palps) and the head capsule (Younossi-Hartenstein et al., 1993; Domínguez and Casares, 2005). The specification of the EAD primordium in the embryo requires the expression of two paralogous Pax6 genes: *twin of eyeless* (*toy*) and *eyeless* (*ey*). *toy* is expressed in the

procephalic ectoderm of blastoderm embryos, overlapping the visual anlage, and is required for the initiation of *ey* expression in the EAD primordium during late embryogenesis (Quiring et al., 1994; Czerny et al., 1999). Consistent with this early expression, animals mutant for *toy* are headless (Kronhamn et al., 2002; Jacobsson et al., 2009). During the second larval stage (L2), the expression of *ey* and *toy* becomes restricted to the posterior region of the EAD. This *toy*+*ey*-expressing region will give rise to the eye and the ocellar primordia, while the anterior region will form the antenna and the maxillary palp (Kenyon et al., 2003). In the eye primordium, definitive specification of the eye is triggered by the transcriptional activation by *ey* of the eyes *absent* (*eya*) and *sine oculis* (*so*) RD

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

<sup>1</sup>Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD), CSIC-UPO, Seville, Spain

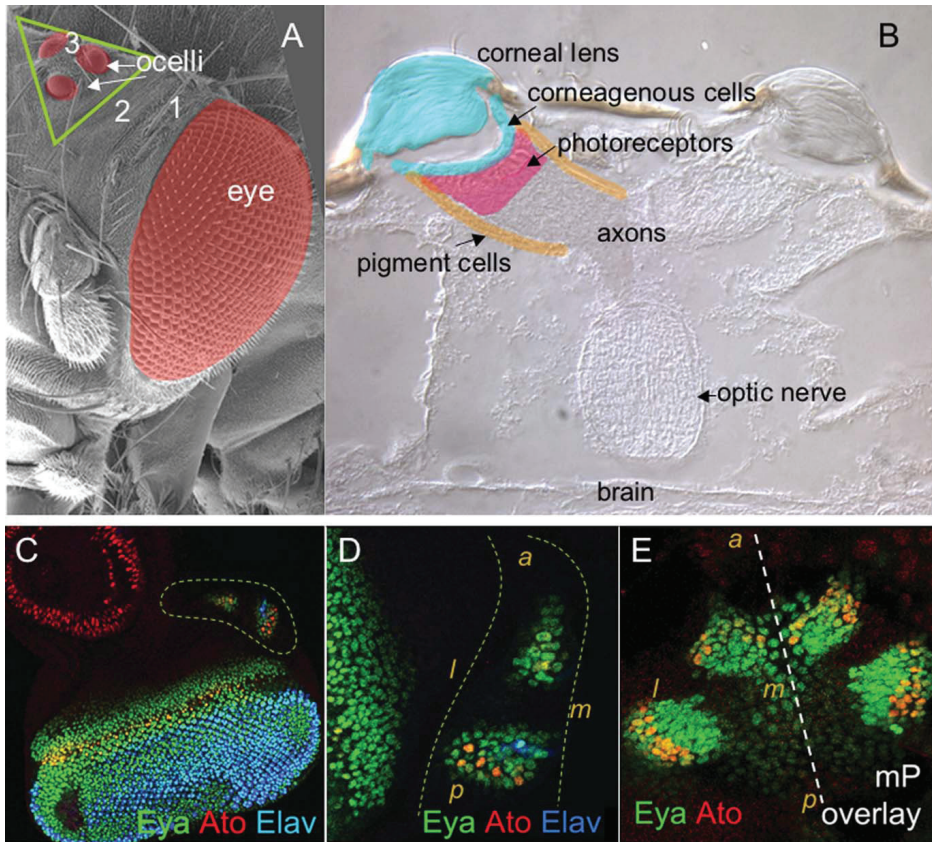
<sup>2</sup>Stazione Zoologica Anton Dohrn (SZN), Seville, Spain

\*Correspondence to: Fernando Casares, CABD, Campus Universidad Pablo de Olavide, 41013, Seville, Spain.

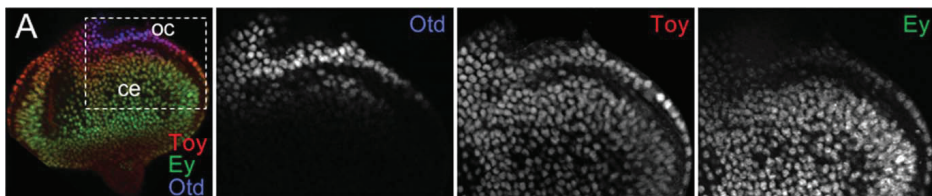
E-mail: fcasfer@upo.es

DOI 10.1002/dvdy.22494

Published online 19 November 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

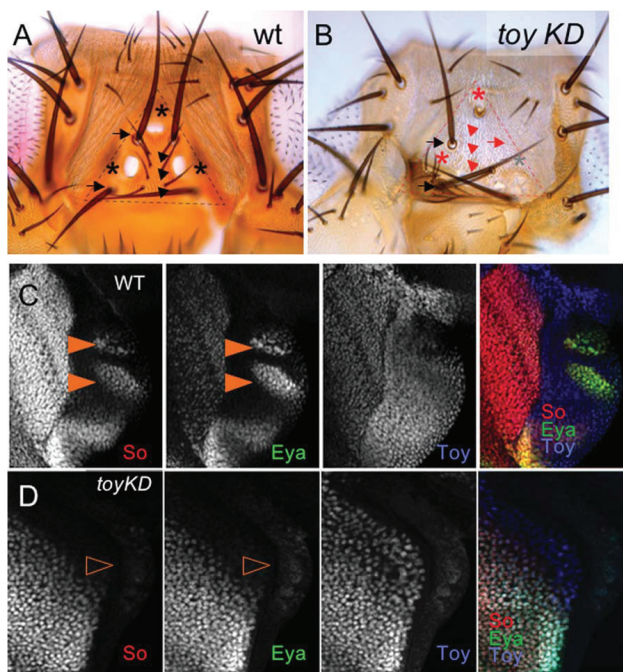


**Fig. 1.** **A:** Pseudocolored scanning electron micrograph of the adult head. From lateral to medial, the dorsal region of the *Drosophila* head capsule is subdivided into (1) orbital cuticle, (2) frons cuticle, and (3) ocellar complex (triangle), which contains the ocelli. **B:** Paraffin section through the posterior ocelli. **C–E:** Confocal images. **C:** An eye-antennal imaginal disc of an early pupa stained for the RD gene *eya*, the proneural gene *atonal* (*ato*) and the photoreceptor differentiation marker *Elav*. The prospective dorsal head region is outlined. **D:** High magnification of the dorsal head primordium. **E:** Dorsal view of fusing eye discs along the dorsal midline (dashed line) in mid-pupal stage (mP). *eya* and *ato* mark the developing ocelli. *a*, anterior; *p*, posterior; *l*, lateral; *m*, medial.



**Fig. 2.** **A:** Early L3 eye-antennal imaginal disc (EAD) stained for Toy, Ey, and Otd proteins. Individual signals are shown from the blown-up region (boxed). Toy immunoreactivity is high in the Otd-expressing prospective dorsal head region of the disc. At this stage, Ey signal in this region is low compared with the adjacent eye primordium, but detectable. *ce*, compound eye primordium; *oc*, dorsal head primordium. In these and following images from EADs, anterior is up.





**Fig. 3.** **A,B:** Dorsal heads of a wild-type (A) and an *oc2>toy-RNAi* (*toyKD*; B) adult. In (A) macrochetae (arrows), interommatidial bristles (whose number ranges between six and eight, arrowheads) and ocelli (asterisks) are marked. In (B) missing or reduced structures are marked with red and grey symbols, respectively. **C,D:** Immunofluorescence images of wild-type (C) and *toyKD* late L3 EADs, stained for So, Eya and Toy. Merged and individual signals are shown. **C:** Solid arrowheads point to the ocellar domains. In D, the open arrowhead indicates the affected ocellar region. Quantification of Eya signal in anterior and posterior ocellar domains showed a reduction to 66% and 53% of wild-type levels. Sample size: nine discs of each genotype (wild-type and *toyKD*). For anterior ocellar region, standard error for wild-type and *toyKD* are 0.882 and 0.432, respectively; Chi-square = 0.0479. For posterior ocellar region, standard error for wild-type and *toyKD* are 0.831 and 0.355, respectively; Chi-square =  $3 \times 10^{-3}$ .

genes. Once expressed, their protein products form a complex required for the downstream activation of the RD gene *dachshund* (*dac*) and the proneural gene *atonal* (*ato*), which feeds back onto *ey* expression (Desplan, 1997; Silver and Rebay, 2005; Kumar, 2009; Amore and Casares, 2010). In this complex, it is thought that the DNA binding domain is provided by *so*, a Six1/2-type homeobox gene. Consistent with their central role, *ey* mutants show reduced or absent eyes and some *eya* and *so* alleles also result in eye-less flies, and ectopic expression of *ey* or *eya* induce ectopic compound eye-type development (Bonini

et al., 1993, 1997; Cheyette et al., 1994; Quiring et al., 1994; Halder et al., 1995, 1998; Pignoni et al., 1997). Once this RD gene network is in place in late L2, retinal differentiation ensues during L3 and early pupal stages. However, the precise timing of *eya* and *so* activation depends on the expression of *homothorax* (*hth*), a TALE-class homeodomain gene of the Meis family. *hth* is co-expressed with *ey* and, together with the Zn-finger transcription factor *teashirt* (*tsh*), maintains cells as undifferentiated and proliferative eye progenitors. It is the repression of *hth* by the localized expression of the BMP2/4-type signal

*decapentaplegic* (*dpp*) that allows the induction of the RD genes and the further installment of the differentiation program (Pai et al., 1998; Bessa et al., 2002; Lopes and Casares, 2010).

By contrast, the gene regulatory network controlling the specification of the ocelli has been less investigated. The ocellar complex develops from the dorsal anterior margin of the EAD (Fig. 1C–E). This region expresses *orthodenticle/ocelliless* (*otd/oc*; Royet and Finkelstein, 1995; Blanco et al., 2009; Wang et al., 2010), and *otd* mutants lack the whole ocellar complex (Finkelstein et al., 1990). Interestingly, the *Otx* genes are expressed in the anterior head and neural tube in vertebrates, pointing to an evolutionarily conserved role for *otd/Otx* genes in cephalic patterning (Finkelstein and Boncinelli, 1994). Similar to the eye, *eya* and *so* are required for ocellar development: the primordia of the anterior and posterior ocelli are marked by two spots where *eya* and *so* are coexpressed, and *eya* and *so* mutants are ocelli-less (Cheyette et al., 1994; Serikaku and O'Tousa, 1994; Pignoni et al., 1997; Zimmerman et al., 2000; Blanco et al., 2009). Blanco and co-workers (Blanco et al., 2009) have shown that *otd* is required for *eya* expression. However, recent work by Wang and co-workers indicates *otd* to have a permissive, rather than an instructive role in ocellar specification: In *otd* mutants (which derepress the Pax6-5a like gene *eyegone* (*eyg*) in the prospective ocellar region) ocelli development is rescued if *eyg* function is simultaneously removed (Wang et al., 2010). This result points to the existence of other factor(s) responsible for initiating RD gene expression. Several facts suggested that one of them might be *toy*. First, *toy* has been shown to be the only Pax6 gene expressed in the prospective ocellar region (Czerny et al., 1999), in contrast to the eye primordium, where both *toy* and *ey* are coexpressed. Second, a *so* enhancer contains *Toy*-specific binding sites which are required for its activity in the ocellar region (Punzo et al., 2002). Third, available *toy* mutants result in mostly head-less flies (Kronhamn et al., 2002). However, some of these animals develop an almost normal head (including compound eyes), but



show impaired ocelli (Jacobsson et al., 2009). Together, these data suggest a major requirement of *toy* in ocellar development.

In this study, we have investigated the functions of *toy*, *so*, *eya*, and *hth*, and their cross-regulatory relationships during ocellar development. Using a targeted gene knock-down approach, we find *toy* to be required for the development of the whole ocellar complex, including the ocelli, indicating that the role of *toy* goes beyond ocelli development to specify a region of the fly's head. When *toy* is knocked down, both *eya* and *so* are down-regulated, and this happens without affecting the *hh* signaling pathway, which is required for *eya* expression (Blanco et al., 2009). Downstream of *toy*, *so* and *eya* are mutually required for their expression. *hth*, which is initially expressed throughout the prospective ocellar region, is later down-regulated by the *hh* signaling. This precise spatial control of *hth* expression determines the size of the ocelli and of the ocellar region as a whole. While this paper was being drafted, Blanco and colleagues published a similar attempt to determine *toy*'s role during ocellar development and the integration of this information in an ocellar gene network (Blanco et al., 2010). We will discuss our results in this context and propose an integrated ocellar gene regulatory network representing the specification of this visual organ.

## RESULTS

### *toy* Is Required for Ocellar Development and RD Gene Expression

The ocellar complex develops in the prospective dorsal head region of the EAD. *otd* is expressed and required for the development of this region (Finkelstein et al., 1990; Royet and Finkelstein, 1995; Blanco et al., 2009; Wang et al., 2010). Using an anti-*Toy* antibody, we detect *toy* expression spanning the *otd*-positive domain in early L3 discs, just before the expression of RD genes (Fig. 2 and not shown). Here, *toy*'s levels are comparable to those found in the compound eye primordium (Fig. 2). Of interest, at this stage *ey* expression, detected

by an anti-Ey antibody, is low, but detectable above background levels (Fig. 2). Later on, *ey* expression becomes fainter (not shown). The expression of *toy* in the ocellar region did not depend on *otd*, because in *oc1* mutant discs, which give rise to ocelli-less adults, *toy* expression levels remain unchanged (not shown). The only *toy* allele molecularly characterized to date, *toy<sup>hdt</sup>*, encodes a truncated Toy protein that lacks part of the homeo-domain and the C-terminal transactivation domain, but which may still retain DNA binding activity through the paired domain (Kronhamn et al., 2002). Therefore, to more clearly dissect *toy*'s role during the development of the ocelli, we decided to use a targeted gene knock-down approach. For this, we drove a *toy*-specific double-stranded RNAi construct (*UAS-toy-RNAi*) to the developing ocellar region, using as driver the *otd* ocellar enhancer (*oc2-GAL4*). This enhancer recapitulates *otd* expression in the developing dorsal head region of the EAD (Blanco et al., 2009).

In *oc2>toy-RNAi* ("*toyKD*") adults, ocelli are significantly reduced and a variable number of chetae are missing. In addition, in a proportion of individuals one or more ocelli are absent (Fig. 3A,B). In L3 discs from *toyKD* larvae, Toy immunoreactivity is reduced to less than 10% of the wild-type levels and, in some cases, no nuclear signal is detected above background (Fig. 3C,D; see the Experimental Procedures section). Therefore, we believe that the *toyKD* phenotype is close to a null, if not a null, for ocellar development.

Next, we tested the effects of *toy* knock-down on the RD genes *eya* and *so*. In *toyKD* discs, the expressions of *eya* or *so*, monitored with specific antibodies, are reduced in a variable amount. Specifically, *eya*'s signal is reduced in the anterior and posterior ocellar domains to 66% and 53%, respectively, of the normal levels. In addition, the remaining expression is often seen in a single domain, instead of the two patches of the wild-type (Fig. 3C,D). These remaining levels of RD expression could explain the residual ocelli still present in the *toyKD* adults. The Hedgehog (Hh) signaling molecule is expressed in a small patch in the prospective ocellar region

(Royet and Finkelstein, 1996), and its signaling activity is required for the development of the ocellar region (Royet and Finkelstein, 1996) and for *eya*'s expression in the ocellar primordia (Blanco et al., 2009). To test if the *toyKD* phenotype was due to an impairment of the *hh* signaling, we used the expression of the pathway's target *patched* (*ptc*) as a readout, and compared *ptc* expression in wild-type and *toyKD* EADs. In wild-type discs, *ptc* is detected overlapping the domains of RD expression (Fig. 4A). In *toyKD* discs the expression levels of *ptc* are comparable to those in wild-type discs, despite the fact that often its signal localized in a single domain (Fig. 4B). Therefore, *hh* signaling is maintained when *toy* expression is removed.

So far, our results indicate that *toy* is required for the normal development of the whole ocellar complex, including the ocelli. Molecularly, the loss of *toy* results in a variable, but significant reduction in *eya* and *so* expression. The effects on RD gene expression do not seem primarily mediated by *toy* affecting the *hh* signaling pathway, because in *toyKD* discs the levels of Ptc, a target of the pathway, are indistinguishable from the control ones.

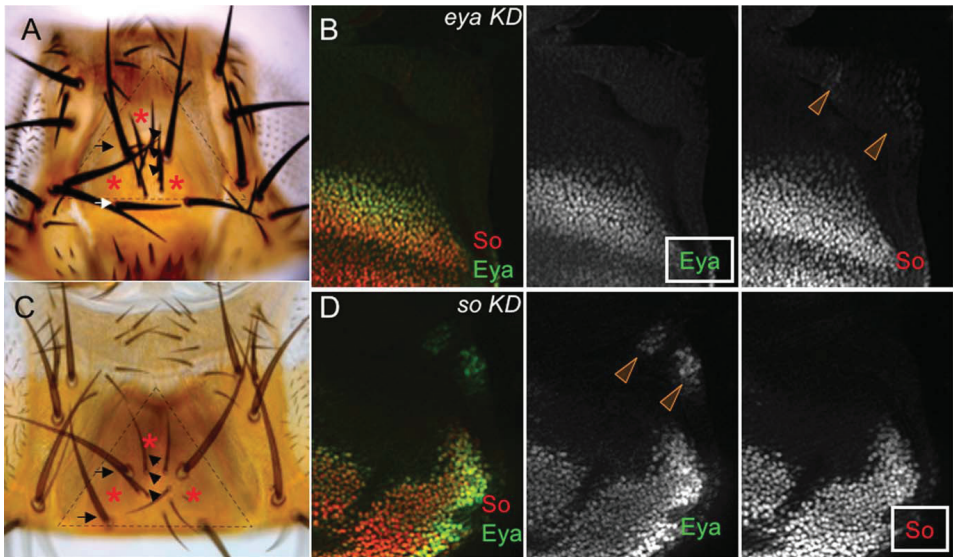
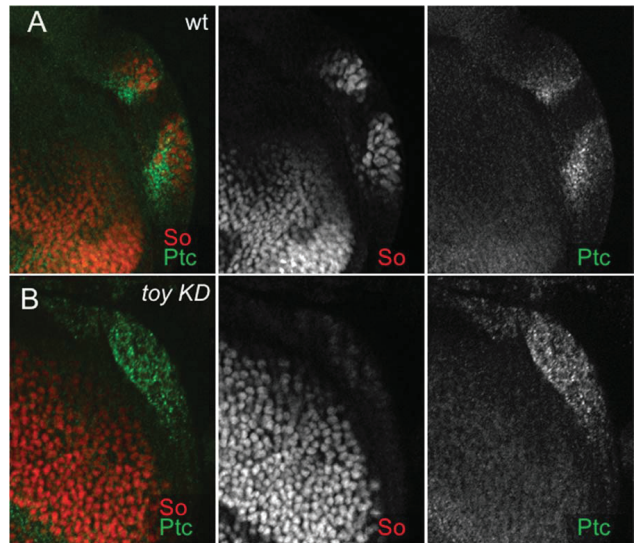
### *eya* and *so* Are Mutually Required for Their Expression Downstream of *toy*

Once their expression is activated, the *eya* and *so* domains strictly overlap, and within these domains the nuclear levels of Eya and So correlate (Fig. 3C). This adjustment of the expression levels might be achieved by mutual cross-regulation. To test this, we generated *eya* and *so* knock-down genotypes by expressing *eyaRNAi* or *soRNAi* molecules driven by *oc2-GAL4*, using a similar approach to that carried out for *toy*. In both *eyaKD* and *soKD* adults the ocelli are consistently missing, without any noticeable effect on other structures in the ocellar complex region (Fig. 5 A,C). This phenotype is similar to that described previously for *eya* and *so* alleles, and restricts RD gene function to the optic component of the



ocellar complex. In agreement with this result, both *eyaKD* and *soKD* results in a dramatic loss of Eya or So immunoreactivity, respectively, down to background levels in the prospective ocellar region. We next analyzed the effects of knocking down one of them on the levels of expression of the other (Fig. 5 B,D). In *eyaKD* discs, *so* expression was dramatically reduced (Fig. 5B). In *soKD* discs *eya* was still detectable. However, the two *eya* patches were reduced in size. In addi-

**Fig. 4.** Prospective ocellar region of wild-type (A) and *oc2-GAL4>UAS-toyRNAi* (*toyKD*; B) discs, stained for So and Ptc. Merged and separate channels are shown. **A:** In the wild-type Ptc is detected in two domains that overlap the ocellar primordia, marked by So. **B:** In *toyKD* discs Ptc is detected at similar expression levels, although in a single broad domain. In *toyKD* (B), the levels of So expression are significantly lower than in the wild-type (A).



**Fig. 5.** **A–D:** Adult heads (A,C) and prospective ocellar region of late L3 eye-antennal imaginal disc (EAD; B,D) of *eyaKD* (A,B) and *soKD* (C,D) individuals. In A and B, ocelli are lost (red asterisks) while ocellar region bristles (black arrows and arrowheads) are normal. For the immunofluorescence images in B and D, merged and individual signals are shown. Orange arrowheads point to the ocellar domains. Quantification of Eya signal in anterior and posterior ocellar domains of *soKD* discs showed a reduction to 45% and 43% of wild-type levels. Sample size: 10 discs of each genotype (wild-type and *soKD*). For the anterior ocellar region, standard error for wild-type and *soKD* are 0.790 and 0.374, respectively; Chi-square =  $4.46 \times 10^{-5}$ . For the posterior ocellar region, standard error for wild-type and *soKD* are 0.744 and 0.362, respectively; Chi-square =  $1.13 \times 10^{-6}$ .

tion, in *soKD* discs, Eya's immunofluorescence signal intensity in the prospective ocellar region dropped to approximately 45% of the wild-type levels (Fig. 5D). Therefore, our results indicate a mutual requirement for *eya* and *so*.

For *eyaKD*, we tested the status of the *hh* signaling pathway by monitoring the levels of Ptc, as we did previously for *toyKD*. We did not detect any significant changes in *ptc* expression levels (Supp. Fig. S1, which is available online), suggesting also that the effects observed when knocking RD genes down were not mediated by interfering with the *hh* pathway.

### ***hth* Controls the Size of the Ocelli and, Together With *toy*, Is Subject to Negative Feedback Regulation**

During the development of the compound eye, progenitor cells express, in addition to the Pax6 genes, two other transcription factors: *hth* and *teashirt* (*tsh*; Bessa et al., 2002). Both are required for the maintenance of progenitors in a proliferative and undifferentiated state. Specifically, *hth* is turned off as cells up-regulate the expression of the RD genes *eya* and *so* (Bessa et al., 2002; Lopes and Casares, 2010). To test whether these genes could also be part of the ocellar gene regulatory network, we examined their expression relative to that of *toy* and the RD genes. We did not detect *tsh* expression in the prospective ocellar region at any time during L2 or L3, using an anti-Tsh antiserum or a *tsh* reporter (*tsh-GAL4*; not shown). In contrast, *hth* was expressed uniformly through the ocellar region, together with *toy*, during early L3 (Fig. 6A). However, both *toy* and *hth* were progressively down-regulated in the ocellar primordia during mid- to late L3, as RD expression became established in them (Figs. 6B,C, 7D), so by the end of L3/ beginning of pupal stages the *eya/so* ocellar domains coincide with a minimum of *toy/hth* expression. Next, we tested a possible role for *hth* by generating both loss-of-function and gain-of-function genotypes (Fig. 7). In *oc2>hthRNAi* (*hthKD*) flies, the ocelli became dramatically enlarged and

fused. In addition, the whole ocellar complex cuticle expanded at the expense of the lateral frons cuticle (Fig. 7A,B). Overexpression of *hth* in *oc2>GFP-hth* (*hthOE*) flies led to the opposite phenotype: the obliteration of the ocellar complex (Fig. 7B,C). In agreement with the adult phenotypes, in *hthKD* discs, *eya* expression expanded and the two ocellar domains fused, (Fig. 7E), while *hth* overexpression reduced, but did not completely eliminate, the expression of *eya* and *so* (Fig. 7F) in the ocellar primordium. The down-regulation of *toy* did not seem to be that critical, as *toy* overexpression in the ocellar region resulted in no obvious phenotype (not shown). Therefore, the precise developmental regulation of *hth* expression is essential for the control of the size of the ocellar region and, in particular, of the size of the ocelli. Two facts led us to ask whether the *hh* signaling pathway could be responsible for the modulation of *hth* levels: first, *hh* is required for the development of the ocellar complex (Royet and Finkelstein, 1996); second, in the compound eye, although the major repressor of *hth* is *dpp*, in the absence of the latter, the *hh* pathway is capable of repressing *hth* (Lopes and Casares, 2010). Indeed, when *hh* is blocked by the expression of a dominant negative form of the Ihh co-receptor *ptc* (Briscoe et al., 2001) in the prospective ocellar region (*oc2>GFP-ptcδloop2*), *hth* was now uniformly expressed (Fig. 8A,B).

## **DISCUSSION**

The ocelli represent another model in which to study the gene regulatory network controlling the specification and patterning of visual organs. Each ocellus is composed of a retinal cup, capped with a corneal lens, and ensheathed by a pigment cell layer, thus representing a simple eye design (Land and Nilsson, 2002). Ocellar development offers a point of comparison with the compound eye, thereby allowing the extraction of common and, perhaps general, principles operating during visual organ development (Friedrich, 2006). In this study, we have probed this gene regulatory network by studying the expression, regulation, and role of *toy*, *hth*, *elo*, *eya*,

and *so*, members of the Pax6, Meis, Eya, and Six gene families, as they play major roles during vertebrate and insect eye development.

### ***toy* Works Upstream of the RD Genes *eya* and *so* and Is Required for the Development of the Whole Ocellar Complex**

*toy* is continuously expressed in the dorsal anterior part of the EAD, where the ocellar complex forms. The fact that *toy*'s knock-down affects the ocelli, but also the surrounding ocellar bristles, indicates that *toy* is required more as a region-specific gene than as an ocellus selector. Our results are in agreement with the phenotypic analysis of *toy<sup>hdl</sup>* flies by Jacobsson and co-workers (Jacobsson et al., 2009). Although most *toy<sup>hdl</sup>* flies are headless (Kronhamn et al., 2002), some individuals develop head structures, frequently with abnormal or absent ocelli (Jacobsson et al., 2009). Blanco co-workers (Blanco et al., 2010) have recently reported a genotype in which, by using an embryonic *toy* enhancer, the embryonic function of *toy* is supplied to *toy<sup>hdl</sup>* background. In this manner, rescued animals should exhibit phenotypes resulting from the loss of *toy* function during larval life. However, only 40% of the animals of this genotype showed an ocellar phenotype suggesting a secondary role for *toy* during ocellar development. Nevertheless, these same authors report in their study, as data not shown, their isolation of an ocellus-specific *toy* allele with a stronger penetrance of the ocellar phenotype. This, together with the fact that 100% (N > 20) of the *toyKD* animals showed ocellar defects, and the results reported by Jacobsson, indicates a more significant role for *toy* in ocellar development than realized in (Blanco et al., 2010). Variable perdurance of the Toy protein driven by the embryonic enhancer into the larval EAD might explain the lower expressivity and penetrance observed by these authors. Interestingly, although *toy* is expressed in the EAD primordium and throughout its larval development, it seemed that its major larval site of action was the



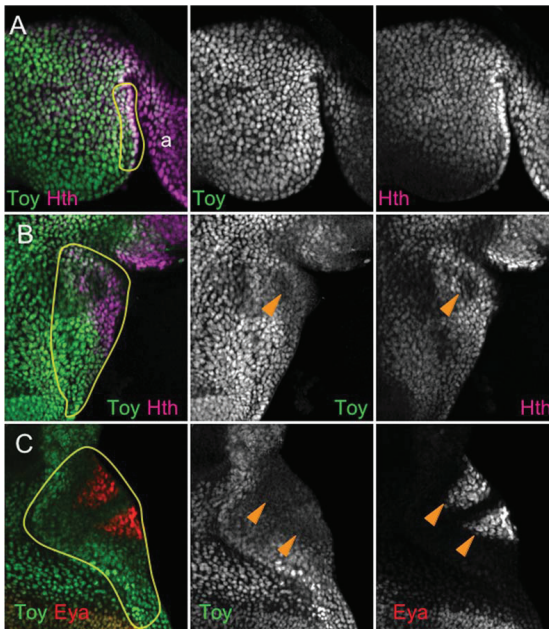


Fig. 6.

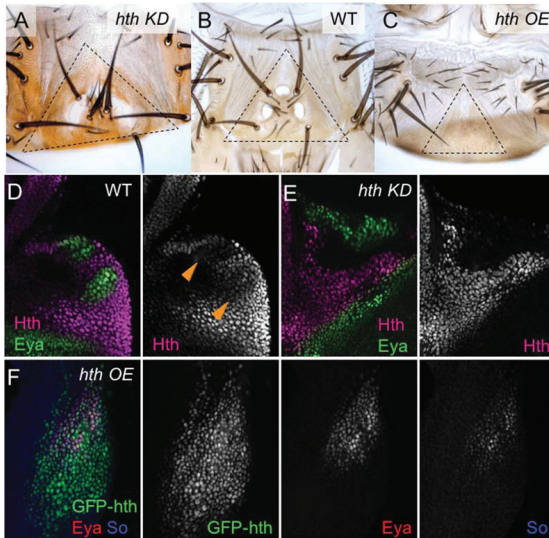


Fig. 7.

ocellar region. Thus, driving *toyRNAi* with *ey-GAL4* to knock-down *toy* throughout the larval EAD only results in ocellar phenotypes, despite *toy*'s intense expression in the eye and proximal antennal discs (A.B. and F.C., unpublished observations). To determine whether there are subtle defects that have passed unnoticed to us, or otherwise why *toy* expression is maintained during larval development in areas other than the ocellar region, further work is needed.

Still, removing *toy* function in *toyKD* animals does not result in a total loss of *eya* and *so*, as has been also observed by Blanco and co-workers (Blanco et al., 2010), pointing to additional regulators. Likely these regulators lie downstream of the *hh* pathway. First, this pathway is required for the development of the whole ocellar complex and, in particular, for the expression of *eya* (Royet and Finkelstein, 1996; Blanco et al., 2009), indicating both, field and organ specification functions. In addition, our results suggest that the pathway remains active in the absence of *toy* and, therefore, can activate RD genes expression independently of it. Therefore, *toy* and *hh* signaling integration happens through an AND logic: the absence of either input results in abolishment (or a very low level of expression) of downstream target genes' expression, as results presented in Figures 3, 4, and 8 suggest. In any case, determining whether *hh* signaling pathway's input on *eya* and/or *so* is *direct* will require

**Fig. 6.** A–C: Early, mid, and late L3 discs (A–C, respectively) co-stained for Toy and Hth (A,B) and Toy and Eya (C). The prospective ocellar region is outlined. **A,B:** Toy and Hth expression is uniform in the ocellar region in early discs (A), but by mid L3 (B) expression decreases (arrowhead). **C:** In late L3 discs these regions of down-regulated Toy expression coincide with the peaks of Eya that correspond with the ocelli primordia (arrowheads).

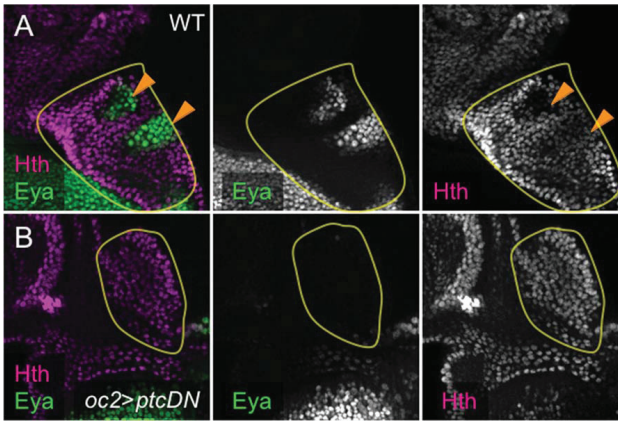
**Fig. 7.** A–C: Adult dorsal heads of *oc2>UAS-hthRNAi* (A: *hthKD*), wild-type (B), and *oc2>UAS-GFP-hth* (*hthOE*; C). Triangles outline the ocellar complex. **D–F:** Ocellar complex region of late L3 eye-antennal imaginal discs (EADs) from wild-type, *hthKD*, and *hthOE* larvae stained for Hth and Eya (D,E) or Hth, Eya and So (F). Merged and separate signals are shown.

the study of their respective ocellar-specific regulatory regions.

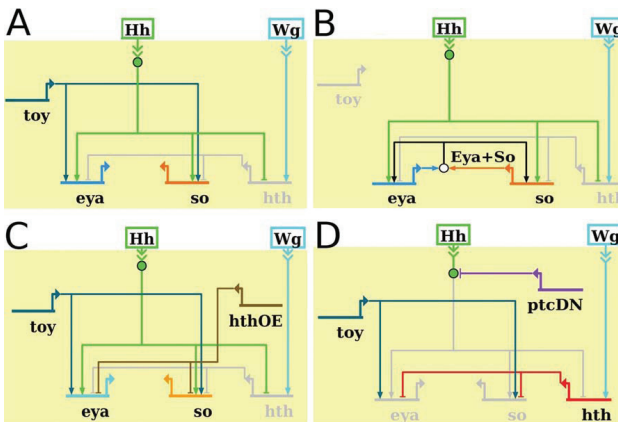
The fact that *toy* expression is progressively turned off in the ocellar domains suggests that *toy* may be required for the initiation of RD expression, but not for its maintenance. This seems to parallel the regulation of *ey* and *toy* during compound eye development: both genes are

expressed anterior to the morphogenetic furrow but turned off posterior to it (Quiring et al., 1994; Czerny et al., 1999). In this maintenance phase, *eya* would play a major role. Thus, *eya* has been shown to be necessary and sufficient for the activation of the *so* ocellus-specific autoregulatory element (Pauli, 2005; Blanco, 2010). Therefore, once *eya* and *so* have been turned on,

through the independent inputs from, at least, *toy* and *hh*, *eya* would contribute to the maintenance of *so* through autoregulation. It has been previously reported that either in *so* mutants (Pauli et al., 2005) or in *so* mosaics (Blanco et al., 2010), *eya* expression remains unchanged. However, in our *soKD* experiment, we detected a reduction in the size of the *eya* expression domains and in its levels. We attribute this discrepancy to the fact



**Fig. 8.** A,B: Prospective ocellar regions (outlined) from wild-type (A) and *oc2>GFP-ptcΔloop2* (*oc2>ptcDN*; B) late L3 EADs, stained for Hth and Eya. Merged and individual signals are shown. **A:** At this stage, there is a down-regulation of *hth* expression in the prospective ocellar domains (arrowheads), more notably in the anterior one (in early pupal stages also the posterior ocellar domain shows a more pronounced decrease; not shown). **B:** This down-regulation is lost in *oc2>ptcDN* discs in which the *hh* pathway is blocked, as indicated by the absence of Eya signal.



**Fig. 9.**

**Fig. 9.** A–D: Regulatory interactions inside wild-type ocellar cells (A,B) and upon expression of either *hth* (*hthOE* in C) or a dominant negative version of Ptc (*ptcDN* in D). Each gene is represented by a horizontal segment line topped by a bent arrow (representing the transcriptional start site, TSS); positive and negative interactions are symbolized respectively by arrows or barred lines emerging from the TSS. Active genes are shown in colors, inactive ones are grayed. The Eya–So protein complex is represented with a white bubble, while a green bubble symbolizes Hh signal transduction. Chevrons are used to indicate cell signaling, boxes for signaling ligands. **A:** Early on, *toy* and the Hh signal transduction pathway (“Hh” in the diagram) provide two independent inputs allowing the onset of *eya* and *so* expression. These two inputs might be integrated through an AND logic. *hth* expression is down-regulated thanks to the transduction of *hh* signaling; therefore, full expression of *eya* and *so* is allowed in these cells. A positive input on *hth* is also indicated. This is proposed to be provided by the *wg* signaling pathway, based on previous work in the eye and other imaginal discs (see main text for references). *wg* input is shown as active (in color) to justify *hth* activation in prospective ocellar cells, observed upon *ptcDN* expression (Fig. 8). Note that *hh* and *wg* have nonoverlapping patterns in the ocellar region of the L3 disc (Royet and Finkelstein, 1996). **B:** Later on, transcription of *eya* and *so* is ensured by the installment of a feed-back loop: a protein–protein complex is formed (Eya+So), which maintains the expression of *eya* and *so* genes even in the absence of *toy*’s expression. Although Hh signaling is shown as being active in this stage, it is not known whether it is necessary or not for *eya* and *so* expression maintenance; however, this input is used to keep *hth* expression at low levels in the ocellar primordia. **C:** *hth* ectopic expression (*hthOE* in the diagram) results in reduction (indicated with a lighter color for *eya* and *so*) but not complete abolishment of RD gene expression in prospective ocellar cells (according to what shown in Fig. 7). This is because of the persistence of *toy* and Hh inputs. **D:** Expression of a dominant negative version of Ptc (*ptcDN*), results in an interference with Hh signal transduction. This in turn removes the repression on *hth* and eliminates a necessary input on *eya* and *so*. As a result no RD gene expression is allowed.



that only after quantification of Eya's immunofluorescence signal we realized that there was indeed a reduction, even though the signal was clearly detectable. Therefore, our results point to a positive feedback loop in which *so* would also contribute to *eya* expression. Because the *eya* and *so* products form a protein complex (Pignoni et al., 1997), this feedback loop might be involved in maintaining a constant Eya-So stoichiometry. Interestingly, this *eya-so* network module is also conserved in other *Tribolium* (Yang et al., 2009).

### The Size-Control Function of *hth* in the Ocellar Region Points to Key Differences in How Ocelli and Eyes Are Regulated

Ocelli are much smaller than compound eyes. A single ocellus contains approximately 80 photoreceptor cells, while a compound eye comprises around 1,600. The growth of the eye relies on at least two pathways that stimulate proliferation in the *hth*-expressing progenitor population. On the one hand, Notch signaling leads to the chain activation of *eyg* and *unpaired* (*upd*), a JAK/STAT ligand (Chao et al., 2004; Dominguez et al., 2004; Tsai and Sun, 2004; Reynolds-Kenneally and Mlodzik, 2005; Gutierrez-Avino et al., 2009). On the other, *hth*, downstream of the *wingless* (*wg*) Wnt signaling pathway (Pichaud and Casares, 2000; Baonza and Freeman, 2002) forms a protein complex together with *tsh* and the *hippo* pathway cotranscription factor *yorkie* (*Yki*; Peng et al., 2009). However, these routes seem not to be active in the ocelli. Neither *eyg* is expressed in the prospective ocelli (Wang et al., 2010) nor the JAK/STAT is active there (Ekas et al., 2006; Gutierrez-Avino et al., 2009). And *tsh*, a component of the Hth-Yki-Tsh complex is not expressed in the developing ocelli neither (this study). In this context, *hth* controls the size of the ocelli, at least by regulating the extent of *eya* expression, and does not seem to be implicated in proliferation control. However, two *hth* regulatory relationships are shared between ocelli and compound eyes: (1) the down-regulation

of *hth* by the *hh* signaling pathway to avoid (2) *hth* interference with the further activation of the differentiation pathway. What the mechanism of this interference may be is still not clear, but the results fit a model where *hth* sets a threshold for an ocelli-inducing signal. Thus, loss of *hth* phenocopies overactivation of the *hh*-pathway caused by overexpression of Ci155, the transcriptional activator form of Ci (Amin et al., 1999), while overexpression of *hth* obliterates the ocellar complex, as does the loss of *hh* activity (Amin et al., 1999). Due to the major role played by the *hh* pathway, *hth* might raise its signaling threshold to set limits on *hh*'s realm of action, perhaps by acting as a direct repressor of *hh* targets.

### A Regulatory Circuitry for Sharp Gene Expression Boundaries

In all, our results suggest a more complex scenario than that presented by Blanco and colleagues (Blanco et al., 2010) (Fig. 9). First, early *toy* expression would be necessary to initiate the expression of the *eya* and *so* RD genes but also of as yet unknown genes implicated in ocellar cuticle development. The evidence available to date is compatible with *toy* acting directly on *so* expression through its binding to an enhancer region (Pauli et al., 2005) and, directly or indirectly, on *eya* (Pauli et al., 2005; Blanco et al., 2010). Once their expression is initiated, normal levels of both *eya* and *so* depend on *so*'s autoregulation (Pauli et al., 2005) and on their mutual activation (this work). In addition, RD expression depends critically on the *hh* signaling pathway (Royet and Finkelstein, 1996; Blanco et al., 2009), which seems to operate in parallel to *toy*. The *wg* and *hh* pathways have been shown to act antagonistically in the specification of the ocellar complex (Royet and Finkelstein, 1996). *hth*, whose expression is activated by the *wg* signaling in several imaginal discs, including the EAD (Casares and Mann, 2000; Azpiazu and Morata, 2000; Pichaud and Casares, 2000; Baonza and Freeman, 2002) might be mediating this antagonism. The resulting gene network (Fig. 9) gives

some hints on how its regulatory circuitry ensures sharp differences in expression levels of RD genes within the prospective ocellar complex. This is obtained through both positive and negative mechanisms. The "AND" logic gate engaging *toy* and *hh* signaling triggers RD gene expression (Fig. 9A). This is followed by the maintenance loop animated by the Eya and So (which most likely works by means of the formation of a protein-protein complex: Fig. 9B) described above, are the positive inputs. On the other hand, preventing RD gene expression outside these ocellar domains is achieved not merely through the operation of a single repressor, as *hth* overexpression inside prospective ocellar cells (where *toy* and *hh* transduction are most likely still active) cannot block completely RD expression (Figs. 7, 9C). Complete obliteration of RD genes expression is instead obtained when *hh*'s positive input is also eliminated (Figs. 8, 9D). Therefore, only the combination of a repressive input and the absence of a positive one allows the definition of a clean boundary between RD-expressing and nonexpressing cells. Furthermore, down-regulation of *hth* (which happens inside the ocellar cells) is induced by the *hh* signaling. This provides an explanation for why ectopic activation of the *hh* pathway forces cells into assuming an ocellar fate (Amin et al., 1999). In these cells, (already expressing *toy*) the presence of the Hh positive input would clear the *hth*'s repressive one. As a consequence of these regulatory operations, an equilibrium between positive and negative inputs is established that results in the sharp definition of ocelli and cuticle domains and their development into organs of the correct size.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Drosophila* Strains and Genetic Manipulations

*oc2-GAL4* (Blanco et al., 2009) was used to drive UAS-lines specifically in the developing dorsal anterior portion of the eye-antennal imaginal disc (EAD), where the ocellar region derives from. In the case of *UAS-dsRNAi* strains, crosses were raised



at 29°C, to maximize the penetrance of the knock-downs. Other crosses were set at 25°C. UAS-lines used were as follows: *UAS-toyRNAi* (15919), *UAS-eyRNAi* (106628), *UAS-eyaRNAi* (43911), *UAS-soRNAi* (104386), *UAS-hthRNAi* (12763), from the VDRC (<http://stockcenter.vdrc.at/control/main>). *UAS-GFP-hth(8)* (Casares and Mann, 2000), *UAS-GFP-ptcΔloop2* ("*UAS-ptcDN*", Briscoe et al., 2001), *UAS-toy* (Czerny et al., 1999). *tsh-GAL4* was used as a *tsh* reporter (Wu and Cohen, 2000).

Adult cuticle preparations: Dorsal head pieces were separated from the head using a razor blade and processed as in Casares and Mann (2000). Images were obtained in a Leica DM5000B microscope with a Leica DFC490 digital camera and processed with Adobe Photoshop.

### Immunofluorescence and Quantifications

First, we determined at what specific developmental stage the two anterior and posterior ocellar domains, marked with *eya* and *so*, were clearly visible in the disc. To this, we used as "internal timer" the extent of retinal differentiation, measured as number of differentiated ommatidial rows. In control discs, the two ocellar domains were strongly marked by the expression of either *eya* or *so* after 10 ommatidial rows had been formed, regardless of the culture temperature being 25 or 29°C. Thereafter, the analyses of these genes' expression were carried out in L3 discs older than 10 ommatidial rows.

Immunofluorescence was carried out as in Bessa and Casares (2005). Antibodies used were: rabbit anti-Otd (gift from T. Cook), mouse anti-Ey (gift from P. Callaerts), rabbit anti-Toy (Jacobsson et al., 2009), guinea pig anti-Hth (Casares and Mann, 2000), guinea pig anti-So (Mutsuddi et al., 2005), mouse anti-PTC (Nakano et al., 1989), rabbit anti-Ato (Jarman et al., 1995), and rabbit anti-Tsh (Wu and Cohen, 2000). Mouse anti-Eya (10H6) and rat anti-Elav (7E8A10) were from the Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa. Appropriate Alexa-conjugated secondary antibodies were used. Image acquisition was carried out in a Apo-

tome Zeiss Axio Imager M2 fluorescence microscope (except for Fig. 1 C–D), to maximize signal detection. Data in Figure 1C,D was acquired with a Leica SP2-AOBS confocal system. Images were processed with Adobe Photoshop. Signal intensity was measured with ImageJ software. The region of interest was outlined with the Freehand tool and signal intensity was measured. For each disc, immunofluorescence signal in the ocellar domains was measured relative to the signal in the eye primordium in similar sized areas. Signal in distal antenna was considered background levels. Five discs were measured for each genotype.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. Blanco for the *oc2-GAL4* line, and P. Callaerts, I. Guerrero, I. Rebay, T. Cook, F. Pignoni, A. Rasmuson-Lestander, Y.N. Jan, and the Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, for antibodies and fly strains and A. Iannini, A. Lago, and other Casares lab members for critical reading of the manuscript. Imaging of samples was carried out at the CABD Advanced Light Microscopy Facility. A. Prado produced and kindly provided the sections from which the image in Figure 1B was obtained.

### REFERENCES

- Amin A, Li Y, Finkelstein R. 1999. Hedgehog activates the EGF receptor pathway during *Drosophila* head development. *Development* 126:2623–2630.
- Amore G, Casares F. 2010. Size matters: the contribution of cell proliferation to the progression of the specification *Drosophila* eye gene regulatory network. *Dev Biol* 344:569–577.
- Baonza A, Freeman M. 2002. Control of *Drosophila* eye specification by Wingless signalling. *Development* 129: 5313–5322.
- Bessa J, Casares F. 2005. Restricted teashirt expression confers eye-specific responsiveness to Dpp and Wg signals during eye specification in *Drosophila*. *Development* 132:5011–5020.
- Bessa J, Gebelein B, Pichaud F, Casares F, Mann RS. 2002. Combinatorial control of *Drosophila* eye development by eyeless, homothorax, and teashirt. *Genes Dev* 16:2415–2427.
- Blanco J, Seimiya M, Pauli T, Reichert H, Gehring WJ. 2009. Wingless and Hedgehog signaling pathways regulate orthodenticle and eyes absent during ocelli development in *Drosophila*. *Dev Biol* 329:104–115.
- Blanco J, Pauli T, Seimiya M, Udolph G, Gehring WJ. 2010. Genetic interactions of eyes absent, twin of eyeless and orthodenticle regulate sine oculis expression during ocellar development in *Drosophila*. *Dev Biol* 344:1088–1099.
- Bonini NM, Leiserson WM, Benzer S. 1993. The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell* 72:379–395.
- Bonini NM, Bui QT, Gray-Board GL, Warlick JM. 1997. The *Drosophila* eyes absent gene directs ectopic eye formation in a pathway conserved between flies and vertebrates. *Development* 124: 4819–4826.
- Briscoe J, Chen Y, Jessell TM, Struhl G. 2001. A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol Cell* 7:1279–1291.
- Casares F, Mann RS. 2000. A dual role for homothorax in inhibiting wing blade development and specifying proximal wing identities in *Drosophila*. *Development* 127:1499–1508.
- Chao JL, Tsai YC, Chiu SJ, Sun YH. 2004. Localized Notch signal acts through eyg and upd to promote global growth in *Drosophila* eye. *Development* 131:3839–3847.
- Cheyette BN, Green PJ, Martin K, Garren H, Hartenstein V, Zipursky SL. 1994. The *Drosophila* sine oculis locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron* 12: 977–996.
- Czerny T, Halder G, Kloter U, Souabni A, Gehring WJ, Busslinger M. 1999. twin of eyeless, a second Pax-6 gene of *Drosophila*, acts upstream of eyeless in the control of eye development. *Mol Cell* 3: 297–307.
- Desplan C. 1997. Eye development: governed by a dictator or a junta? *Cell* 91: 861–864.
- Dominguez M, Casares F. 2005. Organ specification-growth control connection: new insights from the *Drosophila* eye-antennal disc. *Dev Dyn* 232:673–684.
- Dominguez M, Ferres-Marco D, Gutierrez-Avino FJ, Speicher SA, Beneyto M. 2004. Growth and specification of the eye are controlled independently by Eyegone and Eyeless in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* 36:31–39.
- Donner AL, Maas RL. 2004. Conservation and non-conservation of genetic pathways in eye specification. *Int J Dev Biol* 48:743–753.
- Ekas LA, Baeg GH, Flaherty MS, Ayala-Camargo A, Bach EA. 2006. JAK/STAT signaling promotes regional specification by negatively regulating wingless expression in *Drosophila*. *Development* 133:4721–4729.
- Finkelstein R, Boncinelli E. 1994. From fly head to mammalian forebrain: the





- story of *otd* and *Otx*. *Trends Genet* 10: 310–315.
- Finkelstein R, Smouse D, Capaci TM, Spradling AC, Perrimon N. 1990. The orthodenticle gene encodes a novel homeo domain protein involved in the development of the *Drosophila* nervous system and ocellar visual structures. *Genes Dev* 4:1516–1527.
- Friedrich M. 2006. Ancient mechanisms of visual sense organ development based on comparison of the gene networks controlling larval eye, ocellus, and compound eye specification in *Drosophila*. *Arthropod Struct Dev* 35:357–378.
- Gutierrez-Avino FJ, Ferrer-Marco D, Dominguez M. 2009. The position and function of the Notch-mediated eye growth organizer: the roles of JAK/STAT and four-jointed. *EMBO Rep* 10: 1051–1058.
- Halder G, Callaerts P, Gehring WJ. 1995. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* 267:1788–1792.
- Halder G, Callaerts P, Flister S, Walldorf U, Kloter U, Gehring WJ. 1998. Eyeless initiates the expression of both *sine oculis* and *eyes absent* during *Drosophila* compound eye development. *Development* 125:2181–2191.
- Jacobsson L, Kronhamn J, Rasmuson-Lestander A. 2009. The *Drosophila* Pax6 paralogs have different functions in head development but can partially substitute for each other. *Mol Genet Genomics* 282:217–231.
- Jarman AP, Sun Y, Jan LY, Jan YN. 1995. Role of the proneural gene, *atonal*, in formation of *Drosophila* chordotonal organs and photoreceptors. *Development* 121:2019–2030.
- Kenyon KL, Ranade SS, Curtiss J, Mlodzik M, Pignoni F. 2003. Coordinating proliferation and tissue specification to promote regional identity in the *Drosophila* head. *Dev Cell* 5:403–414.
- Kronhamn J, Frei E, Daube M, Jiao R, Shi Y, Noll M, Rasmuson-Lestander A. 2002. Headless flies produced by mutations in the paralogous Pax6 genes *eyeless* and *twin* of *eyeless*. *Development* 129:1015–1026.
- Kumar JP. 2009. The molecular circuitry governing retinal determination. *Biochim Biophys Acta* 1789:306–314.
- Land MF, Nilsson D-E. 2002. *Animal eyes*. New York: Oxford University Press.
- Lopes CS, Casares F. 2010. *hth* maintains the pool of eye progenitors and its downregulation by Dpp and Hh couples retinal fate acquisition with cell cycle exit. *Dev Biol* 339:78–88.
- Mutsuddi M, Chaffee B, Cassidy J, Silver SJ, Tootle TL, Rebey I. 2005. Using *Drosophila* to decipher how mutations associated with human branchio-oto-renal syndrome and optical defects compromise the protein tyrosine phosphatase and transcriptional functions of eyes absent. *Genetics* 170:687–695.
- Nakano Y, Guerrero I, Hidalgo A, Taylor A, Whittle JR, Ingham PW. 1989. A protein with several possible membrane-spanning domains encoded by the *Drosophila* segment polarity gene *patched*. *Nature* 341:508–513.
- Pai CY, Kuo TS, Jaw TJ, Kurant E, Chen CT, Bessarab DA, Salzberg A, Sun YH. 1998. The Homothorax homeoprotein activates the nuclear localization of another homeoprotein, extradenticle, and suppresses eye development in *Drosophila*. *Genes Dev* 12:435–446.
- Pauli T, Seimiya M, Blanco J, Gehring WJ. 2005. Identification of functional *sine oculis* motifs in the autoregulatory element of its own gene, in the *eyeless* enhancer and in the signalling gene *hedgehog*. *Development* 132: 2771–2782.
- Peng HW, Slattey M, Mann RS. 2009. Transcription factor choice in the Hippo signaling pathway: homothorax and yorkie regulation of the microRNA *bantam* in the progenitor domain of the *Drosophila* eye imaginal disc. *Genes Dev* 23:2307–2319.
- Pichaud F, Casares F. 2000. homothorax and iroquois-C genes are required for the establishment of territories within the developing eye disc. *Mech Dev* 96: 15–25.
- Pignoni F, Hu B, Zavitz KH, Xiao J, Garrity PA, Zipursky SL. 1997. The eye-specification proteins *So* and *Eya* form a complex and regulate multiple steps in *Drosophila* eye development. *Cell* 91: 881–891.
- Punzo C, Seimiya M, Flister S, Gehring WJ, Plaza S. 2002. Differential interactions of *eyeless* and *twin* of *eyeless* with the *sine oculis* enhancer. *Development* 129:625–634.
- Quiring R, Walldorf U, Kloter U, Gehring WJ. 1994. Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the *Small eye* gene in mice and *Aniridia* in humans. *Science* 265:785–789.
- Reynolds-Kenneally J, Mlodzik M. 2005. Notch signaling controls proliferation through cell-autonomous and non-autonomous mechanisms in the *Drosophila* eye. *Dev Biol* 285:38–48.
- Royet J, Finkelstein R. 1995. Pattern formation in *Drosophila* head development: the role of the orthodenticle homeobox gene. *Development* 121:3561–3572.
- Royet J, Finkelstein R. 1996. *hedgehog*, wingless and orthodenticle specify adult head development in *Drosophila*. *Development* 122:1849–1858.
- Serikaku MA, O'Tousa JE. 1994. *sine oculis* is a homeobox gene required for *Drosophila* visual system development. *Genetics* 138:1137–1150.
- Silver SJ, Rebey I. 2005. Signaling circuitries in development: insights from the retinal determination gene network. *Development* 132:3–13.
- Tsai YC, Sun YH. 2004. Long-range effect of *upd*, a ligand for Jak/STAT pathway, on cell cycle in *Drosophila* eye development. *Genesis* 39:141–153.
- Wang LH, Huang YT, Tsai YC, Sun YH. 2010. The role of *eyg* Pax gene in the development of the head vertex in *Drosophila*. *Dev Biol* 337:246–258.
- Wu J, Cohen SM. 2000. Proximal distal axis formation in the *Drosophila* leg: distinct functions of *teashirt* and *homothorax* in the proximal leg. *Mech Dev* 94:47–56.
- Yang X, Zarinkamar N, Bao R, Friedrich M. 2009. Probing the *Drosophila* retinal determination gene network in *Tribolium* (I): the early retinal genes *dachshund*, *eyes absent* and *sine oculis*. *Dev Biol* 333:202–214.
- Younossi-Hartenstein A, Tepass U, Hartenstein V. 1993. Embryonic origin of the imaginal discs of the head of *Drosophila melanogaster*. *Dev Genes Evol* 203:60–73.
- Zimmerman JE, Bui QT, Liu H, Bonini NM. 2000. Molecular genetic analysis of *Drosophila* eyes absent mutants reveals an eye enhancer element. *Genetics* 154: 237–246.







